

Aus der Klinik für Neurologie  
(Prof. Dr. med. M. Bähr)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Untersuchung der Wirkung des antiaggregativen  
Compounds anle138b auf Löslichkeit und Toxizität  
von mutierter SOD1**

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

vorgelegt von  
**Alexander Kleinknecht**  
aus  
Bischkek/Kirgisistan

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. Mathias Bähr

Ko-Referent: Prof. Dr. Oliver Wirths

Datum der mündlichen Prüfung: 07.11.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Untersuchung der Wirkung des antiaggregativen Compounds anle138b auf Löslichkeit und Toxizität von mutierter SOD1“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 07.05.2017

.....

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	4
Tabellenverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	6
1.1 Amyotrophe Lateralsklerose, SOD1 und anle138b .....	6
1.1.1 Definition der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS).....	6
1.1.2 Epidemiologie .....	6
1.1.3 Klinische Symptome der ALS .....	6
1.1.4 Ätiologie und Pathogenese .....	8
1.1.5 Superoxiddismutase (SOD) .....	9
1.1.6 SOD-Mutationen.....	11
1.1.7 Proteinaggregation .....	12
1.1.8 Anle138b .....	13
1.1.9 <i>B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur</i> -Mausmodell der ALS .....	14
1.2 Zielsetzung .....	15
2. Material und Methoden .....	16
2.1 Material.....	16
2.2 Methoden .....	21
2.2.1 Semiquantitative Bestimmung der SOD1 in Zellkultur .....	21
2.2.1.1 Erhaltung der Zellkultur .....	21
2.2.1.2 Calcium-Phosphat-Transfektion mit SOD1-Vektoren.....	22
2.2.1.3 Inkubation mit anle138b .....	24
2.2.1.4 Lyse und Detergensextraktion der SOD1-Aggregate.....	24
2.2.1.5 Dot Blotting .....	25
2.2.1.6 Western Blotting.....	27
2.2.2 Tierexperimentelle Untersuchung .....	29
2.2.2.1 Versuchsdesign.....	29
2.2.2.2 Genotypisierung und Auswahl der Mäuse .....	29
2.2.2.3 Versuchsgruppen.....	30
2.2.2.4 Abbruchkriterien – präterminale Gruppe.....	31
2.2.2.4.1 Gewichtsverlust.....	31
2.2.2.4.2 Verlust motorischer Fähigkeiten .....	31
2.2.2.5 Rahmenbedingungen der Tierhaltung .....	32
2.2.2.5.1 Versuchsraum.....	32

---

2.2.2.5.2	Tierhaltung .....	32
2.2.2.6	Perfusion und Präparation der Mäuse .....	34
2.2.2.7	Lyse der Rückenmarkpräparate für die Dot Blot-Analysen .....	34
2.2.2.8	Dot Blot der Rückenmarklysate .....	35
2.2.2.9	Immunhistochemie .....	35
2.3	Statistische Methoden .....	36
3.	Ergebnisse .....	37
3.1	Kontrolle des Transfektionserfolgs .....	37
3.2	Verdünnungsversuche .....	38
3.3	Wirkung von anle138b auf hSOD1 in Zellkultur .....	41
3.3.1	Reduktion der Proteinaggregation unter anle138b in Zellkultur .....	41
3.3.2	Akkumulation der Gesamt-hSOD1 in HEK293 unter Behandlung mit anle138b .....	45
3.3.3	Kontrolle der Ultrazentrifugation der Detergens-unlöslichen hSOD1-Aggregate .....	46
3.4	Wirkung von anle138b auf hSOD1 im Mausmodell .....	47
3.4.1	Exponentielle Akkumulation der SOD1-Aggregate im Rückenmark der <i>B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur</i> -Mäuse über die Lebensspanne unter Behandlung mit anle138b .....	47
3.4.2	Gesamt-SOD1-G93A im Rückenmark der <i>B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur</i> -Mäuse .....	50
3.5	Anle138b ohne neuroprotektiven Effekt im Mausmodell .....	52
3.5.1	Die immunhistochemische Färbung der $\alpha$ -Motoneurone der <i>Intumescencia lumbalis</i> zeigt keinen neuroprotektiven Effekt durch anle 138b .....	52
4.	Diskussion .....	55
4.1	Verdünnungsversuche .....	55
4.2	Proteinaggregation unter anle138b in Zellkultur .....	55
4.3	Molekularbiologische Untersuchung des Rückenmarks der <i>B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur</i> -Mäuse .....	57
4.4	Immunhistochemische Färbung der $\alpha$ -Motoneurone des Lumbalmarks der <i>B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur</i> -Mäuse .....	59
5.	Zusammenfassung .....	61
6.	Literaturverzeichnis .....	66
	Publikation zum Thema der Dissertation .....	69
	Danksagung .....	70
	Lebenslauf .....	71

## Abkürzungsverzeichnis

127X	<i>Frameshift</i> an Stelle 127 und ein verfrühtes Stopcodon
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
bp	Basenpaare
BTA	Biologisch technische/r Assistent/in
C9ORF72	<i>Chromosome 9 open reading frame 72</i> , Gen und gleichnamiges Protein, häufig vorkommend in Neuronen
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ChAT- Antikörper	Choline O-Acetyltransferase-Antikörper
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cu/Zn	Kupfer/Zink
d	Tag(e)
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fALS	familiäre amyotrophe Lateralsklerose
FCS	<i>Fetal calf serum</i> = Fetales Kälberserum
FUS	<i>Fused in sarcoma</i> = Gen mit Funktionen innerhalb der motorischen Nervenzelle
G85R	Austausch der Aminosäure Glycin durch Arginin an der Stelle 85 der Primärstruktur des Proteins
G93A	Austausch der Aminosäure Glycin durch Alanin an der Stelle 93 der Primärstruktur des Proteins
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H <sub>2</sub> O dest.	Destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBS	HEPES <i>buffered saline</i> , siehe HEPES
HEK293-Zellen	<i>Human Embryonic Kidney</i> -Zellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

---

HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
IE/IU	Internationale Einheit
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
Lsg.	Lösung
M	Mol
M.	Morbus
MBR	<i>Metal-binding region</i> des Proteins
MercaptoEtOH	Mercaptoethanol
n	Anzahl
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NP-40	Nonoxynol 40
P	Pellet
p	Signifikanzniveau
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potentia hydrogenii</i> = Stärke des Wasserstoffs
qm	Quadratmeter
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
sALS	Sporadische amyotrophe Lateralsklerose
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SOD1	Superoxiddismutase 1
sog.	sogenannt
Std.	Stunde(n)
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> , Tween
TDP-43	<i>transactive response DNA-binding protein 43 kDa</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TEN-Puffer	Tris-EDTA-NaCl-Puffer
tg	transgen

Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Chlorwasserstoff
Tween	nicht-ionisches Detergens
Ü	Überstand
V	Volt
wt	Wildtyp
WTL	<i>Wildtype-like</i> -Proteinstruktur
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturelle Darstellung der SOD1 .....	10
Abbildung 2: Strukturformel des Di-Phenyl-Pyrazols .....	13
Abbildung 3: Strukturformel von anle138b.....	13
Abbildung 4: SOD1-Vektoren .....	23
Abbildung 5: <i>B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur</i> -Maus in Seitenlage .....	31
Abbildung 6: Käfig mit Streu, Streu, Häuschen und Laufrad mit Sensor .....	32
Abbildung 7: Vorrichtung zur Futter- und Wasserversorgung im Käfig.....	33
Abbildung 8: HEK293-Zellen nach Transfektion mit GFP-getagten hSOD1-Konstrukten ....	37
Abbildung 9: Western Blot aus hSOD1-G93A-transfekzierter Zellkultur mit unterschiedlichen Konzentrationen anle138b.....	38
Abbildung 10: SOD1-G93A-Aggregation in anle138b-Verdünnungsreihe in zwei Zellkulturversuchen (HEK293-Zellen) .....	40
Abbildung 11: Dot Blot aus Zellkulturlysaten zur semiquantitativen Bestimmung des Quotienten P/Ü.....	41
Abbildung 12: Einfluss von anle138b auf die Aggregation von hSOD1-G85R in HEK293-Zellkultur .....	42
Abbildung 13: Einfluss von anle138b auf die Aggregation von hSOD1-G93A in HEK293-Zellkultur .....	43
Abbildung 14: Einfluss von anle138b auf die Aggregation von hSOD1-127X in HEK293-Zellkultur .....	44
Abbildung 15: Gesamt-SOD1 in HEK293-Zellen unter Behandlung mit anle138b.....	45
Abbildung 16: Kontrolle des Ultrazentrifugationsassays .....	46
Abbildung 17: Dot Blots aus Rückenmarklysaten transgener Mäuse zur semiquantitativen Bestimmung des Quotienten P/Ü .....	48
Abbildung 18: SOD1-Aggregation im Rückenmark von G93A-Mäusen mit Placebo- und Verumfutter (anle138b).....	49
Abbildung 19: Gesamt-SOD1-G93A im Rückenmark der <i>B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur</i> -Mäuse mit Placebo- (grün) und Verumfutter (anle138b, blau) im Alter von 70 Tagen bis präterminal symptomatisch mit ca. 135 Tagen .....	51
Abbildung 20: Rückenmarkschnitt der <i>Intumescencia lumbalis</i> einer <i>B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur</i> -Maus mit gefärbten $\alpha$ -Motoneuronen (ChAT-positiv), im vergrößerten Ausschnitt markiert mit roten Pfeilen .....	52
Abbildung 21: Die Zählung der $\alpha$ -Motoneurone im Rückenmark von <i>B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur</i> -Mäusen mit Placebofutter gegenüber Verumfutter (anle138b) zeigt keinen signifikanten neuroprotektiven Effekt ( $p=0,83$ , $n=10$ ) .....	54
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve für die Überlebenszeit der transgenen Mäuse .....	63
Abbildung 23: Koordinatorische und motorische Fähigkeiten (Rotarod-Versuch) .....	64

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Material.....	20
Tabelle 2: Versuchstiergruppen der Rückenmarklysate (je vier Tiere).....	30
Tabelle 3: Versuchstiergruppen der immunhistochemischen Untersuchung.....	30
Tabelle 4: Inhalts- und Zusatzstoffe des Mäusefutters.....	33
Tabelle 5: Mittelwerte der $\alpha$ -Motoneuronzählungen.....	53

# 1. Einleitung

## 1.1 Amyotrophe Lateralsklerose, SOD1 und anle138b

### 1.1.1 Definition der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS)

Die ALS ist eine Erkrankung aus der Gruppe der motorischen Systemdegenerationen mit rascher, kombinierter Degeneration des 1. und 2. Motoneurons, die in der sog. Pyramidenbahn die Willkürmotorik repräsentieren. Die Zellkörper des 1. Motoneurons liegen dabei im primär motorischen Kortex. Dieser ist unmittelbar verantwortlich für die willkürlichen Bewegungsabläufe. Die Zellfortsätze (Axone) dieser Nervenzellen ziehen im sog. *Traktus corticospinalis* ins Hals- und Rückenmark und treten auf unterschiedlichen Ebenen im Vorderhorn der grauen Substanz in synaptische Verbindung mit dem 2. Motoneuron. Die Axone des 2. Motoneurons verlassen das Hals- und Rückenmark und innervieren in der Peripherie die willkürliche Muskulatur.

### 1.1.2 Epidemiologie

Die Mehrzahl aller Betroffenen erkrankt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr (Körner *et al.* 2011), wobei eine Häufung zwischen dem 47. und 52. Lebensjahr bei der hereditären familiären Form (fALS) und bei der sporadischen Form (sALS) zwischen dem 58. und 63. beschrieben ist (Kollewe *et al.* 2008). Männer sind mit einem Verhältnis von 1,6:1 häufiger betroffen als Frauen (Worms 2001). Die Inzidenz wurde für die 1990er Jahre in den europäischen und nordamerikanischen Staaten mit Werten zwischen 1,5 und 2,7 pro 100.000 Einwohner pro Jahr (im Durchschnitt: 1,89/100.000/Jahr) sowie die Prävalenz von 2,7 bis 7,4 pro 100.000 Einwohner pro Jahr (im Durchschnitt: 5,2/100.000/Jahr) erfasst (Worms 2001).

### 1.1.3 Klinische Symptome der ALS

Die Amyotrophe Lateralsklerose (*motor neuron disease*) wurde erstmalig im Jahr 1869 von Jean Marie Charcot beschrieben (Maladie de Charcot, 1869). Es handelt sich um einen Sammelbegriff für progrediente, neurodegenerative Systemerkrankungen des 1. (*upper motor neuron*) und 2. (*lower motor neuron*) Motoneurons. Klinisch ist diese Degeneration durch zentrale Paresen mit spastischen Muskeltonuserhö-

hungen, gesteigerten Muskeleigenreflexen und positiven Pyramidenbahnzeichen (1. Motoneuron, kortikospinales System) in Begleitung von schlaffen Paresen, Muskelatrophien und Faszikulationen (2. Motoneuron, Hirnnervenkerne und Vorderhorn des Rückenmarks) gekennzeichnet. Beteiligt sind Bulbär-, Thorax-, Abdominal-, und Extremitätenmuskulatur. Den globalen Muskelatrophien folgt bei den Patienten ein stetiger Gewichtsverlust durch den Abbau von Muskelmasse. Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf werden die motorischen Einheiten zunächst reaktiv ausgeweitet. Dies hat zur Folge, dass mit dem Untergang dieser größeren motorischen Einheiten größere funktionelle Ausfälle einhergehen und die Progredienz im Verlauf zunimmt. Die Erkrankung beginnt meist fokal, distal, einseitig betont und schreitet generalisierend voran. In 25% der Fälle wird ein bulbärer Beginn beschrieben (Mumenthaler und Mattle 2002). Bei 20 bis 50% der Betroffenen treten kognitive Beeinträchtigungen auf, 2 bis 5% der Fälle entwickeln eine Demenz meist vom frontotemporalen Typ (Kollewe *et al.* 2008).

Lange Zeit wurde neurologischen Ausfällen neben der frontotemporalen Demenz und außerhalb der Pyramidenbahn wenig Beachtung geschenkt. Jedoch bereits in den 80er Jahren publizierte Studien beschrieben eine Störung der Okulomotorik (Leveille *et al.* 1982). Daneben können nach langer Krankheitsdauer auch extrapyramidale Symptome wie Rigor, Bradykinese und posturale Instabilität auftreten (Iwanaga *et al.* 1997). Kürzlich veröffentlichte Studien beschreiben auch eine Schädigung aufsteigender sensibler Fasern bei ALS-Patienten als Korrelat einer Destruktion des sensiblen Systems (Iglesias *et al.* 2015). Die teils schon vor Jahrzehnten beschriebenen klinischen Zeichen über die Pyramidenbahn hinausgehender Schädigung des zentralen Nervensystems bei ALS-Patienten fanden ein pathologisches Korrelat in der Beschreibung des Proteins TDP-43 (Ludolph und Brettschneider 2015). Dazu mehr im folgenden Absatz 1.1.4.

Der Tod tritt bei ALS-Patienten durchschnittlich nach zwei bis drei Jahren bei der bulbären Verlaufsform und nach vier bis fünf Jahren beim spinalen Verlauf meist infolge einer respiratorischen Insuffizienz ein (Wijesekera und Leigh 2009). Jedoch gibt es Fälle mit zehn Jahren und längerer Überlebenszeit (Kollewe *et al.* 2008).

### 1.1.4 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der ALS bleibt bis heute weitestgehend ungeklärt. Die zum heutigen Stand einzige kausale Therapiemöglichkeit mit dem seit 1996 zugelassenen Glutamatantagonisten Riluzol (Rilutek®) basiert auf der Hypothese der Exzitotoxizität und dem daraus resultierenden Untergang der Neurone (Bensimon *et al.* 1994). Da bekannt ist, dass die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einen Zelltod verursachen kann, wurde in der Vergangenheit eine ursächliche Rolle dem oxidativen Stress zugesprochen (Wijesekera und Leigh 2009). Einen ähnlichen Ansatz beschreibt die Hypothese des nitrativen Stresses (Sahawneh *et al.* 2010).

Die Hypothese der mitochondrialen Dysfunktion stützend, wurden bei sALS-Patienten und in transgenen Mausmodellen morphologische und biochemische Abweichungen der Mitochondrien beschrieben (Wijesekera und Leigh 2009). Obwohl ein entzündlicher ZNS-Prozess als Ursache für eine motoneuronale Symptomatik in der differentialdiagnostischen Abklärung ausgeschlossen werden muss, lassen sich aktivierte Mikroglia und dendritische Zellen bei ALS-Patienten und in Mausmodellen als weiterer involvierter Mechanismus nachweisen (Wijesekera und Leigh 2009). Ob diese als ursächlich anzusehen oder lediglich reaktiv sind, bleibt derzeit ungeklärt.

Es gibt Evidenz für die Beteiligungen aller oben beschriebenen Pathomechanismen, weshalb die Identifikation eines bestimmten therapeutischen Targets so schwierig ist. Bereits im Absatz 1.1.2 zur Epidemiologie wurde die Einteilung in sALS, die ca. 90%, und in fALS, die ca. 10% aller Betroffenen ausmachen, erwähnt.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden Mutationen in etlichen Genen beschrieben, die zu einer fALS führen, die häufigsten betreffen die SOD1, gefolgt von RNA- und DNA-bindenden Proteinen FUS (*fused in sarcoma*) und TDP-43 (*transactive response DNA-binding protein 43 kDa*) (Andersen und Al-Chalabi 2011, Arai *et al.* 2006, Liscic und Breljak 2011, Neumann *et al.* 2006). TDP-43 wurde als wesentlicher Bestandteil in der Pathogenese von sowohl sALS als auch fALS beschrieben, das nach neueren Erkenntnissen entsprechend einer sequentiellen, Prion-ähnlichen Ausbreitung über mehrere neuronale Systeme zum neuronalen Zelltod und entsprechender klinischer Präsentation führt (Braak *et al.* 2013). Ebenfalls ursächlich für die ALS wurde die Expansion des Hexanucleotids GGGGCC in der nicht kodierenden Region des C9ORF72-Gens identifiziert (DeJesus-Hernandez *et al.* 2011). Eine der zuletzt beschriebenen genetischen Ursachen ist eine zu *loss of function* führende Mutation des TBK1-Gens (kodierend für *TANK-binding kinase 1*) mit daraus für das Gen folgender

Haploinsuffizienz (Insuffizienz eines haploiden ("halben") Gens im Vergleich zum diploiden Gen) (Freischmidt *et al.* 2015). Auch andere Mutationen lassen sich sowohl in sALS- als auch in fALS-Fällen nachweisen (beispielsweise Mutationen der Gene: FUS, Senataxin, Optineurin (Andersen und Al-Chalabi 2011)), was dafür spricht, dass Gendefekte neben hereditären Fällen auch durch *de novo*-Mutationen verursacht sind. Bei den hereditären Fällen treten autosomal dominante, autosomal rezessive und X-chromosomale Erbgänge auf, und es gibt Familien mit niedriger Penetranz (Andersen und Al-Chalabi 2011). Diese Tatsachen und die Hypothese, dass die Epigenetik und Umwelteinflüsse den Krankheitsprozess mit beeinflussen, führen zu einer breiten Variabilität des Phänotyps.

Die am längsten bekannten und am besten erforschten Mutationen, die zu einer fALS führen, betreffen das Gen der Cu/Zn Superoxiddismutase 1 (SOD1) (Rosen *et al.* 1993) und machen ca. 20% aller hereditären Fälle aus. Diese Tatsache führte zur nomenklatorischen Bezeichnung der SOD1-assoziierten ALS (SOD1-ALS).

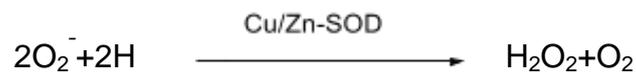
### 1.1.5 Superoxiddismutase (SOD)

Die SOD1 und ihre Mutanten, die zur SOD1-ALS führen, spielten etliche Jahre eine wesentliche Rolle in der ALS-Forschung. Diese Tatsache ergibt sich aus ihrem nicht unwesentlichen Anteil von 12-23% aller fALS- und 2-3% der sALS-Fälle und aus dem über Jahre bestehenden Engpass der etablierten biologischen Modelle für die ALS, die sich auf Erzeugnisse aus SOD1-Mutanten beschränkten.

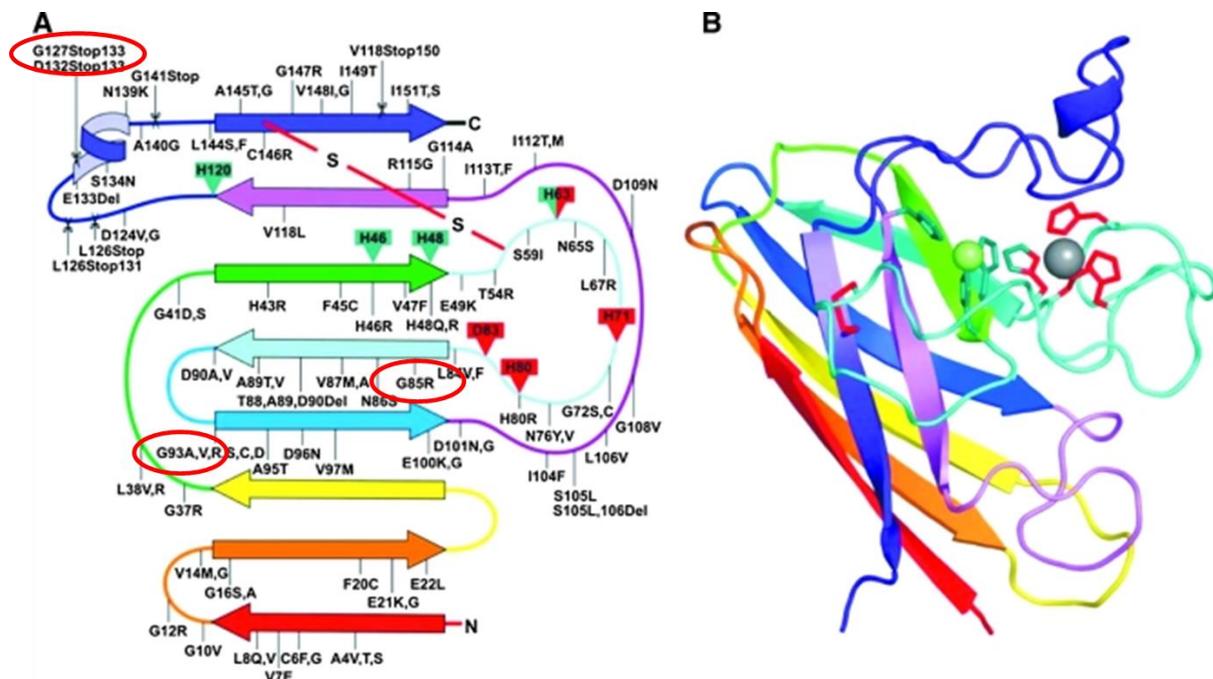
Wesentliches Kennzeichen der SOD1-ALS sind die intraneuronalen Einschlüsse im Rückenmark von Patienten und im Mausmodell, die sich immunhistochemisch neben anderen Proteinen SOD1-positiv darstellen lassen (Watanabe *et al.* 2001).

Physiologisch ist die CuZnSOD ein hoch konserviertes, in Homodimeren vorliegendes, überwiegend zytosolisches Enzym mit einer Größe von 32 kDa und einer Länge von 153 Aminosäuren. Darüber hinaus findet man es im Zellkern und im mitochondrialen Intermembranraum eukaryotischer Zellen, aber auch extrazellulär und im periplasmatischen Raum von Bakterien. Als SOD1 wird die eukaryotische zytoplasmatische Spezies bezeichnet. Sie ist ein wesentlicher Bestandteil der Zelle im Kampf gegen oxidativen und in dem Zusammenhang auch mit nitrativen Stress (Sahawneh *et al.* 2010, Valentine und Hart 2003).

Sie katalysiert dabei die Redox-Reaktion der



beim Abbau von Sauerstoffradikalen. Die Monomere binden im Bereich des aktiven Zentrums je ein  $\text{Cu}^{2+}$  Kation und ein  $\text{Zn}^{2+}$  Kation, die im weiten pH-Bereich von 5,0 bis 9,5 die Redox-Reaktion zu katalysieren ermöglichen und die Enzymstruktur stabilisieren. Das Rückgrat des Enzyms bilden acht Banden  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, die durch große und kleine Loops miteinander verbunden sind, die ihrerseits Funktionen im Bereich der Ionenkomplexierung und Dimerisierung tragen. Ein weiteres stabilisierendes Strukturmerkmal jedes Monomers ist eine Disulfidbrücke (Abbildung 1) (Chattopadhyay und Valentine 2009).



**Abbildung 1: Strukturelle Darstellung der SOD1**

Die Abbildung A zeigt SOD-ALS assoziierte Mutationen. B zeigt die Struktur eines SOD Monomers. Die Farben erlauben einen Vergleich von A und B. Kupferliganden sind in Grün und Zinkliganden in Rot dargestellt. Das Kupferion ist als grüne, das Zinkion als graue Kugel dargestellt. Die intramolekulare Disulfidbrücke erscheint in Rot. Punktmutationen, Deletionen und Insertionen sind mit Linien markiert, wobei Mutationen, die einen C-terminalen Strangabbruch verursachen, durch eine Schere am Ort des Stopcodons dargestellt sind. Rot umrandet sind die in dieser Arbeit eingesetzten Mutanten. Die Grafik ist in veränderter Form entnommen aus der Publikation von Chattopadhyay und Valentine 2009.

### 1.1.6 SOD-Mutationen

Das Gen für die SOD1 befindet sich auf dem Chromosom 21. Die bis zum heutigen Zeitpunkt 165 beschriebenen Mutationen sind folgendermaßen verteilt:

- Über 80% *Missense*-Mutationen
- Etwa 10% *Nonsense*-Mutationen
- Etwa 5% stille Mutationen
- Und in etwa 5% Intron-Mutationen (Kuzma-Kozakiewicz und Kwiecinski 2009)

Dabei gibt es zwischen den Mutanten beträchtliche Unterschiede in der Ausprägung des pathologischen Phänotyps (Kuzma-Kozakiewicz und Kwiecinski 2009).

Die Lokalisation und Art der Mutation können die Funktion des Enzyms unterschiedlich beeinflussen. So wird die G93A-Mutante, bei der es sich um einen Aminosäureaustausch von Glycin zu Alanin handelt, die weitab von funktionellen Domänen der SOD1 liegt und keinen Einfluss auf die Dismutaseaktivität hat, der Gruppe der *Wildtype-like* (WTL)-Mutanten zugeordnet (Valentine *et al.* 2005). Von dieser Mutation betroffene Patienten zeigen nach statistischen Untersuchungen eine Überlebensdauer von ca. eins bis drei Jahren nach Erstmanifestation der Symptome (Valentine *et al.* 2005). Eine weitere Mutante enthält den Aminosäureaustausch von Glycin zu Arginin an der Stelle 85 (G85R). Diese befindet sich in einer Metallbindungsdomäne und repräsentiert die Gruppe der *metal-binding region* (MBR) mit deutlich reduzierter Dismutaseaktivität. Bei dieser Mutation liegen die Überlebensdaten der Patienten im Durchschnitt bei sechs Jahren (Valentine *et al.* 2005). Eine dritte Mutante bewirkt durch eine Insertion von vier Basenpaaren an Stelle 127 (127X) einen *frameshift* und ein verfrühtes Stopcodon an Stelle 133 (Andersen *et al.* 1997). Der Verlust von 21 C-terminalen Aminosäuren umfasst die stabilisierende Disulfideinheit und weitere inter- und intramolekulare Interaktionsstellen. Ferner zeigt die 127X-Mutante eine fehlende SOD-Aktivität (Jonsson *et al.* 2004). Die Quantifizierung der 127X-SOD1 unter Berücksichtigung von Northern Blot-Analysen zeigte in 127X-SOD-Mäusen eine deutliche Reduktion der SOD1-Menge trotz vergleichbarer Syntheseraten, was für einen forcierten Abbau oder einen Zerfall dieser Mutante im Gewebe spricht (Jonsson *et al.* 2004). Die mittlere Überlebensdauer der Patienten mit 127X-SOD1 liegt bei 2,8 Jahren nach Symptombeginn (Andersen *et al.* 1997). Dabei gibt es auch bis ins hohe Lebensalter gänzlich asymptotische Träger von 127X-SOD1 (Andersen *et al.* 1997).

Der Einfluss der Mutationen auf die Enzymfunktion der SOD1 zeigt keine direkte Korrelation mit der Neuropathologie der ALS. SOD Knockout-Mäuse ohne jegliche SOD-Aktivität entwickeln keine Motoneuronenerkrankung, ebenso transgene Mäuse mit überexprimierter humaner Wildtyp-SOD und somit gesteigerter Dismutaseaktivität (Maier und Chan 2002). Gurney *et al.* zeigten 1994 zudem, dass transgene Mäuse mit überexprimierten humanen SOD-Mutanten trotz erhöhter Dismutaseaktivität eine Degeneration von Motorneuronen aufweisen (Gurney *et al.* 1994). Diese Befunde führten zu der allgemein anerkannten „Gain of Function“-Hypothese der mutierten CuZnSOD-Gen-Produkte. Diese besagt, dass eine Mutation dem Protein oder Enzym neue Aktivität verleiht oder seine Aktivität erhöht, was im Fall des o. g. transgenen Mausmodells zu Neurodegeneration führt.

### 1.1.7 Proteinaggregation

Ein typisches neuropathologisches Merkmal von SOD1-ALS sind intraneuronale und intragliale Einschlüsse im Vorderhorn des Rückenmarks *post mortem* untersuchter Patienten (Kato *et al.* 2000). Aber auch in transgenen Mausmodellen mit mutierter humaner SOD1 (Watanabe *et al.* 2001). Diese Einschlüsse sind zum heutigen Zeitpunkt recht gut untersucht und lassen sich immunhistochemisch SOD1-positiv darstellen (Kato *et al.* 2000, Kerman *et al.* 2010). Ebenso lassen sich diese Einschlüsse in transgenen Zellkulturmodellen mit SOD1-Mutanten nachweisen (Witan *et al.* 2008). Witan *et al.* und Karch *et al.* definieren diese Einschlüsse als Detergenzien unlösliche SOD1-positiv Proteinanteile des Zytosols betroffener Zellen, die sich mittels Zentrifugation im Pellet anreichern und im Western Blot nachweisen lassen (Chattopadhyay und Valentine 2009, Karch *et al.* 2009, Witan *et al.* 2009). Die Einschlüsse oder auch Aggregate sind durch fehlgefaltete SOD-Anteile charakterisiert. Evidenz dafür konnten Untersuchungen mittels Antikörpern liefern. Diese Antikörper zielen spezifisch auf und weisen SOD-Anteile mit entfaltetem  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen nach (Kerman *et al.* 2010). Seit etlichen Jahren ist bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Morbus Huntington die Proteinaggregation durch Fehlfaltung von Proteinen ebenfalls bekannt (Uversky 2010).

Bis heute sind die Forschungsbemühungen eine Erklärung des genauen Einflusses der Fehlfaltung und Aggregation auf den Pathomechanismus der ALS schuldig geblieben. Ebenso bleibt zu klären, ob die Reduktion der Aggregate einen Vorteil für die

Neuroprotektion mit sich bringt. Ein zeitlicher Zusammenhang von Aggregation und Pathomechanismus scheint gesichert, da in Tiermodellen das Auftreten intraneuro-naler Einschlüsse eine hohe Korrelation mit dem Einsetzen und Fortschreiten neuro-degenerativer Symptome aufweist (Chattopadhyay und Valentine 2009).

### 1.1.8 Anle138b

Bereits im Prion-Modell und im Morbus Parkinson-Modell, die ebenfalls die Aggregopathien repräsentieren, wurde von Wagner *et al.* anle138b [3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1*H*-pyrazole] als eine Substanz beschrieben, die als Proteinaggregationsinhibitor das Vorkommen von Prionprotein- und  $\alpha$ -Synuclein (typisch für M. Parkinson) -Aggregaten reduziert und dabei das Überleben von Mausmodellen bei der Erkrankung signifikant verlängert (Wagner *et al.* 2013). Chemisch ist anle138b ein Derivat des Di-Phenyl-Pyrazols (Abbildung 2) und ist aufgrund der wenig polaren Anteile des Moleküls eine weitestgehend lipophile Substanz (Wagner *et al.* 2013).

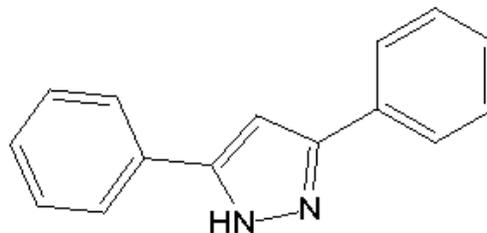


Abbildung 2: Strukturformel des Di-Phenyl-Pyrazols

Die Strukturformel von anle138b ist in Abbildung 3 dargestellt.

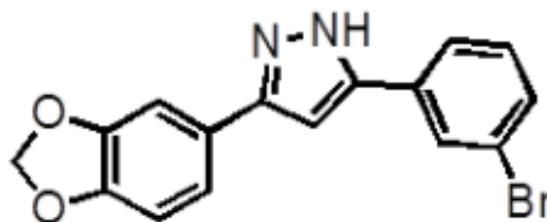


Abbildung 3: Strukturformel von anle138b

Die chemische Formel lautet [3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1*H*-pyrazole] nach Wagner *et al.* 2013 (Wagner *et al.* 2013).

Wie genau anle138b seine Wirkung entfaltet und welche zellulären Bestandteile beeinflusst werden, bleibt zu erforschen und soll nur zum Teil Aufgabe dieser Arbeit sein und deshalb nicht in tiefstem Umfang erfasst werden.

### **1.1.9 *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mausmodell der ALS**

Zum heutigen Stand der ALS-Forschung stellen transgene Mäuse mit der G93A-Mutation der Superoxiddismutase 1 (SOD1), etabliert schon im Jahr 1994 (Gurney *et al.* 1994), den Goldstandard eines unerlässlichen Modellorganismus der ALS dar. Sie entwickeln, beginnend im Alter von drei bis vier Monaten, neuromuskuläre Ausfälle basierend auf dem Untergang der 1. und 2. Motoneurone der Pyramidenbahn, analog zu ALS-Patienten. Sie sterben um die 21. Lebenswoche vorzeitig mit globalen Muskelatrophien und spastischen Paresen an mangelnder Futteraufnahme oder an einer Ateminsuffizienz. Dabei lassen sich im Rückenmark dieser Mäuse in Korrelation zum Krankheitsverlauf Proteinpräzipitate ähnlich denen beim Menschen nachweisen (Watanabe *et al.* 2001).

Da der aktuelle Forschungsstand zu Ätiologie, Pathogenese und möglicher Therapie der ALS zahlreiche Fragen offenlässt, kann auf Tiermodelle wie das *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mausmodell noch nicht verzichtet werden, warum sie auch in dieser Arbeit zum Einsatz kommen.

## 1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation ist die Beleuchtung der Wirkung einer neuartigen Substanz mit der Bezeichnung anle138b auf die Reduktion von Proteinaggregaten und eine mögliche Neuroprotektion in Modellen der amyotrophen Lateralsklerose (ALS), einer tödlichen, zentralnervösen Erkrankung des 1. und 2. Motoneurons aus der großen Gruppe der Aggregopathien. Den hier untersuchten *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäusen wurde anle138b in einer bestimmten Dosis zum Futter beigemischt und gemessen, ob diese Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren ihre motorischen Fähigkeiten länger erhalten und ob sich ihre Überlebenszeit verlängert. Dieser erste Teil war die Arbeit von Stella Thyssen und ich bedanke mich herzlich an dieser Stelle für ihre zur Verfügung gestellten Daten. Des Weiteren wurden in immunhistochemisch gefärbten Rückenmarkschnitten der *Intumescentia lumbalis* die  $\alpha$ -Motoneurone quantifiziert und in einem semiquantitativen Verfahren mittels Ultrazentrifugationsassay und Dot Blot das Verhältnis aus Detergenzien unlöslicher und löslicher SOD1 im Vergleich mit Kontrolltieren untersucht. Daneben wurde in vitro in HEK293-Zellen die Wirksamkeit von anle138b auf die Reduktion von SOD1-Proteinaggregaten untersucht. Es wurden Zellkulturen mit Überexpression von SOD1-Konstrukten mit einer Auswahl von Mutanten mit anle138b behandelt und die Verteilung zwischen löslichen und nicht löslichen SOD1-Anteilen im Vergleich zu unbehandelten Zellen gemessen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien wie Geräte, Verbrauchsmittel und Chemikalien sind samt Hersteller in der folgenden Tabelle alphabetisch aufgeführt.

<b>Geräte und Verbrauchsmittel</b>			
<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Anatomische Pinzette	12-301-10	Martin	Tuttlingen, Deutschland
Auffangflasche von Saugvorrichtungen		FisherThermo Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
Autoklav	VX-120	SysTec GmbH	Bergheim-Glessen, Deutschland
Bunsenbrenner	Flammy s	Schütt Labortechnik GmbH	Göttingen, Deutschland
Dot/Slot-System	SRC 96	Whatman Schleicher & Schuell GmbH	Dassel, Deutschland
Durchlichtmikroskop	ID 02	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Eismaschine		Ziegra Eismaschinen GmbH	Isernhagen, Deutschland
Entwicklermaschine	Curix 60	AgfaPhoto Holding GmbH	Leverkusen, Deutschland
Extinktionsmessgerät	Spectra Rainbow	Tecan	San Diego, CA, USA
Feinwaage	LA 230P	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank	Comfort	Liebherr	Biberach an der Riß, Deutschland
Heizblock	Thermostat plus	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Homogenisator	Precellys 24 lysis & homogenization	Bertin Technologies	Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Imager	Chemi Doc XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Inkubationsschrank mit Rotor	SRT 9D	Stuart, roller mixer	Staffordshire, Großbritannien
Kleine Schere	15024-10	FST Industrie GmbH	Berlin, Deutschland
Kühlschrank	glass line	Liebherr	Biberach an der Riß, Deutschland
Kunststoff- Rotoreinsätze	für 1,5 ml Tubes	Beckmann	Krefeld, Deutschland

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Neubauer-Zählkammer		LO - Laboroptik Ltd	Lancing, Großbritannien
pH-Elektrode	blue line	Schott AG	Mainz, Deutschland
pH-Meter	pH 3210	WTW	Salzhemmendorf, Deutschland
Pipette	Pipetman, 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl,	Gilson, Inc.	Middleton, WI, USA
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG	Eberstadt, Deutschland
Rotor	45Ti	Beckman Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland
Saug-Kompressor	ME 4C/3,4	Schütt Labortechnik GmbH	Göttingen, Deutschland
Schüttler	Shaker-120	Elmi	Riga, Lettland
Sonicator	Sonoplus GM 2070	Bandelin electronic GmbH & Co. KG	Berlin, Deutschland
Sterilbank	Hera safe	Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
Tischwaage	CP 3202 P	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge	5415R	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Ultraschallsonde	UW 2070	Bandelin electronic GmbH & Co. KG	Berlin, Deutschland
Ultrazentrifuge	Discovery 90 SE	Sorvall, Thermo Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
Vortexer	REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Wasserbad		GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH	Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	5810	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

<b>Verbrauchsmittel</b>			
<b>Material</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
2 ml Mikro Schraubröhrchen	72.694.006	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
96-Well-Platten	655180	Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Österreich
Chemilumineszenzfilm	Amersham Hyperfilm ECL 28906837	GE Healthcare GmbH	Solingen, Deutschland
Deckgläser		Gerhard Menzel GmbH	Braunschweig, Deutschland
Falcon-Tubes	15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Österreich
Gummihandschuhe		Paul Hartmann AG	Heidenheim, Deutschland
Kanüle	Eclipse Needle 20G 1TW	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Keramikkugeln Precel-lys	1,4 mm	Peqlab Biotechnologie GMBH	Erlangen, Deutschland
Nitrozellulose-Membran	Pure Nitrocellulose unsupported 0,22 µm	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten	150 mm	Huber & Co. AG	Reinach, Schweiz
Pipettenspitzen	1000 µl, 200 µl, 10 µl	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß, Eppendorf-tube	Mikrotube 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Schraubröhrchen	2 ml	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Österreich
Skalpell		P.J. Dahlhausen & Co. GmbH	Köln, Deutschland
Spritze 1 ml	Inject®-F	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Spritze 5 ml	Discordit 5 ml	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Venenverweilkanüle	Vasofix® Safety 22 g	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Vernichtungsbeutel	861.197	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Whatman-Papier		Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturschalen	100x20 mm	Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Österreich
Zentrifugengefäße	Microfuge Tube Polyallomer 1,5 ml	Beckman Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland

<b>Chemikalien und Medien</b>			
<b>Material</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
0,22 µl Sterilfilter	831.826.001	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Acrylamid 37,5:1	A1379.1000	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
anle138b	8122	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	2.941	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	4621.1	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
CaCl <sub>2</sub>	D7650-10G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
D(+)-Saccharose	6908	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Desoxycholat	D5879-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	34080	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
DMSO	8043.2	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
ECL-Kit	34	Adefo-Chemie GmbH	Dietzenbach, Deutschland
EDTA		PAA The Cell Culture Company	Freiburg, Deutschland
Entwickler	91	Adefo-Chemie GmbH	Dietzenbach, Deutschland
FCS	8342	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Fixierer	4043.1	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Glucose	37.240.500	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Glycerin	6781	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Ketamin 10% für Hunde und Katzen	Medi-Star Arzneimittelvertrieb GmbH	Ascheberg, Deutschland
KCl	3904	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Ketamin	A0830.0500	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	M-6250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	4984	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland

Material	Typ	Hersteller	Firmensitz
Mercaptoethanol	3957.1	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O	16.940.250	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
NaCl	0335.3	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
NP-40		PAA The Cell Culture Company	Freiburg, Deutschland
Paraformaldehyd	23225	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin	A8943,0100	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Pierce® BCA Protein Assay Kit	ADI SOD-100	Enzo Life Sciences GmbH	Lörrach, Deutschland
Ponceau-S	Complete 04693116001	F. Hoffmann-La Roche AG	Basel, Schweiz
Primärantikörper (Dot Blot): Cu/Zn SOD pAb	CN 30.2	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Proteaseinhibitor	SC-2004	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Santa Cruz, CA, USA
SDS	A1379.1000	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Sekundärantikörper (Dot Blot): anti rabbit HRP coupled Ab	T8154	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
TEMED	-	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Tris	13.890.500	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Xylariem®	Riemser Specialty Production GmbH	Laupheim, Deutschland
Trypsin + EDTA	DMEM high glucose (4,5g/l) + L-Glutamin + NaPyruvat, E15-843	PAA The Cell Culture Company	Freiburg, Deutschland
Tween 20	13.890.500	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Xylazin	Xylariem®	Riemser Specialty Production GmbH	Laupheim, Deutschland
Zellkulturmedium	DMEM high glucose (4,5 g/l) + L-Glutamin + NaPyruvat, E15-843	PAA The Cell Culture Company	Freiburg, Deutschland

Tabelle 1: Material

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Semiquantitative Bestimmung der SOD1 in Zellkultur

#### 2.2.1.1 Erhaltung der Zellkultur

**Voll-Medium:** DMEM high glucose (4,5 g/l)

10% FCS

1% Penicillin/Streptomycin

**PBS:** 40 g NaCl

1 g KCl

3,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O

1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

ad 5 l H<sub>2</sub>O dest.

pH 7,4

**Trypsin EDTA:** 0,05% Trypsin

0,02% EDTA

in 100 ml PBS

Zur Bestimmung der antiaggregativen Wirkung von anle138b auf mutierte SOD1 in Zellkultur wurden HEK293-Zellen (Graham *et al.* 1977) eingesetzt. Die Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen in 10 ml full-DMEM high glucose (4,5 g/l)-Medium bei 37°C unter 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank in Kultur gehalten. Bei einer Konfluenz von ca. 80% im Durchlichtmikroskop wurden die Zellen zwei bis drei Mal pro Woche im Verhältnis von 1:5 gesplittet. Für die Versuche wurden Zellen nicht älter als in der vierzigsten Passage verwendet.

Die Arbeit mit der Zellkultur erfolgte stets an der Sterilbank. Alle verwendeten Lösungen und Medien wurden im Vorfeld im Autoklav sterilisiert. Vor dem Einsatz an der Zellkultur wurden die Lösungen und Medien im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

Zum Splitten wurde zuerst das Medium aus der Zellkulturschale mit den Zellen abgesaugt. Die Zellen wurden achtsam mit 3 ml PBS gewaschen und anschließend 8 min

mit Trypsin+EDTA und PBS im Verhältnis von 1:2 im Brutschrank inkubiert. Das sorgt dafür, dass sich die adhärennten Zellen ablösen. Um den Trypsinverdau zu stoppen, wurden die Zellen zügig in ein 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert und mit 5 ml full-Medium versetzt. Die Zellen wurden bei ca. 300 g in einer Zentrifuge pelletiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 1 ml full-Medium vorsichtig resuspendiert. Ein Fünftel dieser Zellsuspension wurde in 10 ml frisches full-Zellkulturmedium gegeben und die Zellen durch leichtes Schwenken in der Zellkulturschale homogen verteilt.

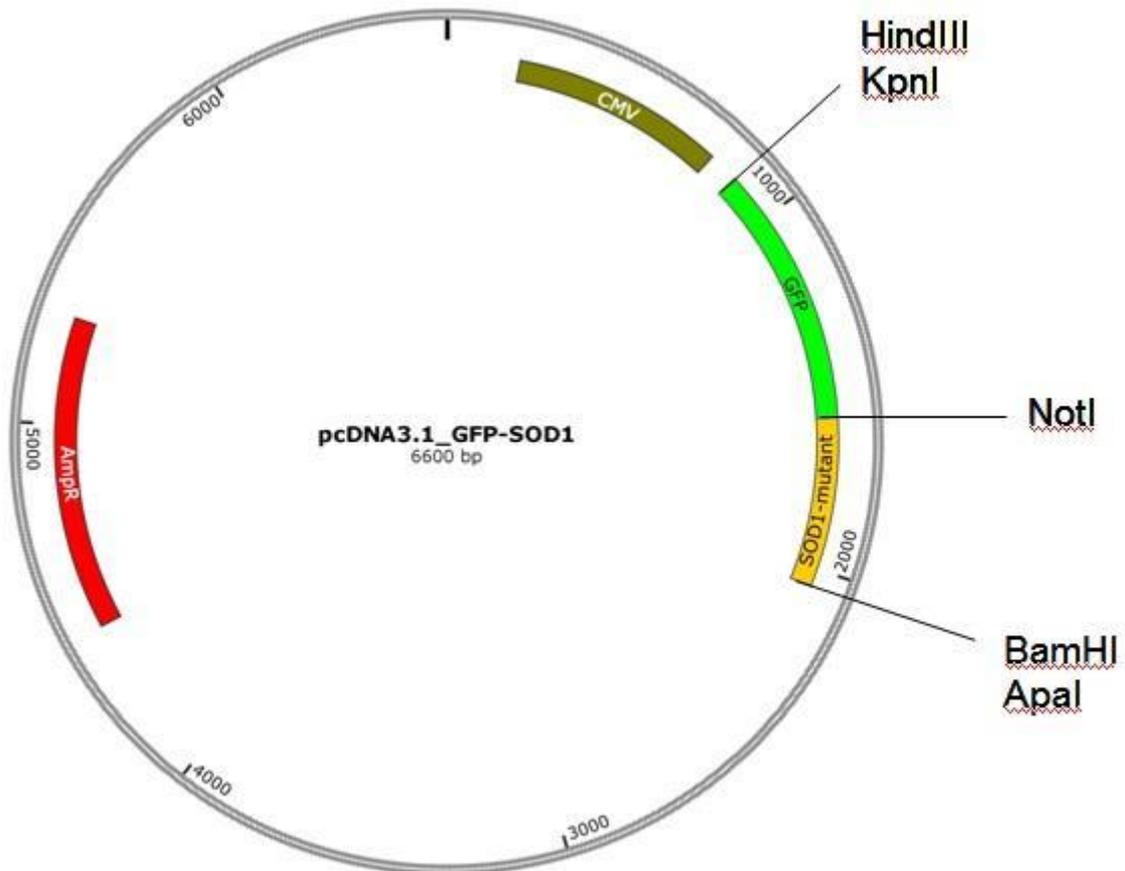
### 2.2.1.2 Calcium-Phosphat-Transfektion mit SOD1-Vektoren

**2xHBS:** 280 mM NaCl  
10 mM KCl  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
12 mM Glucose  
50 mM HEPES  
in H<sub>2</sub>O dest.  
pH 7,04/7,05  
sterilisieren durch 0,22 µm - Filter

**2,5 M CaCl<sub>2</sub>:** 2,5 M CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O  
in H<sub>2</sub>O dest.  
sterilisieren durch 0,22 µm - Filter

**Transfektionsmedium:** DMED high glucose (4,5 g/l)  
2% FCS

Die Transfektion der Plasmid-DNA wurde mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation realisiert (Graham und van der Eb 1973). Bei dieser Methode der Transfektion wird in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat die DNA (Plasmid-DNA) an ausfallendes Calciumphosphat gebunden. Die ausgefallenen Kristalle werden der Zellkultur zugegeben und von den Zellen durch Endocytose aufgenommen. Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in Abbildung 4 dargestellt.

**SOD1-Vektoren:****Vektor:**

pcDNA3.1, 5446 bp  
(Invitrogen, Carlsbad, CA, US)

**Insert:**

GFP (~ 700 bp), human SOD1 – mutant  
SOD-mutant = wt / G85R / G93A / 127X

**Abbildung 4: SOD1-Vektoren**

Die Plasmide wurden freundlicherweise von Frau Dr. Bettina Göricke zur Verfügung gestellt.

24 Stunden vor der Transfektion mittels der Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitation wurden für jede Mutante in je zwei 10 cm Zellkulturschalen mit 8 ml full-Medium jeweils 1,6 Millionen Zellen ausplattiert. Am Transfektionstag wurden je Mutante 20 µg Plasmid-DNA (10 µg pro Zellkulturschale), freundlicherweise in Maxi-Präparationen von Christine Poser (BTA) hergestellt, in 900 µl H<sub>2</sub>O dest. gelöst, dann wurden 100 µl CaCl<sub>2</sub> und 1 ml 2xHBS mit achtsamem Mischen hinzugegeben und nach 50 sec Inkubationszeit in 16 ml bereit gehaltenes Transfektionsmedium pipettiert. Dieses Transfektionsreagenz wurde zu 9 ml pro Zellkulturschale den Zellen zugegeben nachdem das full-Medium abgesaugt war. Die Zellen wurden nun 12 Std. im Brutschrank bei oben beschriebenen Bedingungen inkubiert.

### 2.2.1.3 Inkubation mit anle138b

**anle Stock-Lsg.:** 3,43 g anle138b ad 10 ml DMSO (10 mM)

Das Transfektionsmedium wurde nach 12 Std. entfernt. Den transfizierten Zellkulturen mit den vier unterschiedlichen SOD1-Mutanten (wt, G85R, G93A, 127X) wurde full-Medium mit jeweils 30  $\mu\text{mol/l}$  anle138b zuvor gelöst in DMSO hinzugegeben. Zu jeder Zellkultur mit anle138b wurde eine Kontrolle mit einer äquivalenten Menge an DMSO inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubation mit anle138b wurden die Zellen lysiert, um die SOD1 des Zytosols messen zu können, mit dem Ziel den Einfluss von anle138b auf die gelösten und aggregierten SOD1-Anteile semiquantitativ zu bestimmen.

Die Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  anle138b wurde aus zwei Gründen gewählt. (1) In Versuchen zur Bioverfügbarkeit und anle138b-Konzentrationen im Gehirn von Mäusen lagen die Werte etwa im Bereich von 25–125  $\mu\text{mol/l}$  bei oraler Applikation (Wagner *et al.* 2013). (2) Diese Konzentration zeigte sich ebenfalls aus einer Verdünnungsreihe von 0, 5, 10, 20, 30 und 40  $\mu\text{mol/l}$  in einem *in vitro*-Versuch mit der hSOD1-G93A im analogen Versuchsaufbau wie zuvor beschrieben als die effektivste bei der Reduktion des P/Ü-Quotienten. Die Durchführung dieser Versuche mit Lyse der Zellen und Analyse der SOD1-Verteilung geschah entsprechend der beschriebenen Methoden.

### 2.2.1.4 Lyse und Detergensextraktion der SOD1-Aggregate

**TEN-Puffer:**

- 1 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0
- 1 ml 100 mM EDTA pH 8,0
- 2 ml 5 M NaCl
- ad 100 ml H<sub>2</sub>O dest.

Die abgelösten Zellen samt Medium wurden in ein 15-ml-Falcon-Tube überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und verworfen, die Zellen in 400  $\mu\text{l}$  1xTEN-Puffer mit Proteaseinhibitor resuspendiert und in verschraubbare 2 ml Sarstedt-Röhrchen überführt. Das folgende Protokoll samt der eingesetzten Puffer wurde mit wenigen Modifikationen von Karch *et al.* übernommen (Karch *et al.*

2009). In Folge wurden die Lysate stets unter eisgekühlten Bedingungen verarbeitet, um die Proteinbestandteile möglichst stabil zu halten. Vorerst wurde mit zehn 1,4 mm Keramikkugeln von peqlab Technologies pro Röhrchen im Homogenisator (Bertin Technologies) 1x35 sec homogenisiert, 400 µl 1xTEN mit Proteaseinhibitor und 1% NP-40 zur Suspension hinzugegeben und in ein verschließbares 1,5-ml-Beckmann-Zentrifugationsröhrchen überführt. Es folgte der erste Ultrazentrifugationsschritt bei 100.000 x g und 4°C für 5 min. Der Überstand der Lysate, der nun die gelösten SOD1-Anteile enthalten sollte, wurde in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt und zur Lagerung bei -20°C eingefroren. Das Pellet wurde in 500 µl 1xTEN-Puffer samt Proteaseinhibitor und 0,5% NP-40 durch 3x10 sec Sonication bei 70%iger Leistung unter konsequenter Kühlung resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen wie im Vorfeld zentrifugiert. Dieses Mal wurde der Überstand verworfen und das Pellet unter gleichen Sonication-Bedingungen wie oben in 1xTEN-Puffer samt Proteaseinhibitor, 0,5% NP-40, 0,25% SDS und 0,5% Desoxycholat resuspendiert. Die in dieser Suspension enthaltenen Proteinbestandteile stellen *per definitionem* unter anderem Detergens unlösliche SOD1-Aggregate dar (Karch *et al.* 2009, Witan *et al.* 2009, Witan *et al.* 2008). Diese wurden, um sie stabil zu halten, ebenfalls bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.5 Dot Blotting

<b>4xTris-HCl:</b>	0,5 M Tris 0,4% SDS <i>ad</i> 100 ml H <sub>2</sub> O dest. pH 6,8
<b>6xSDS-Puffer:</b>	7 ml 4xTris-HCl/SDS, pH 6,8 3 ml Glycerin 1 g SDS 0,6 ml MercaptoEtOH
<b>TEN-Puffer:</b>	1 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0 1 ml 100 mM EDTA pH 8,0 2 ml 5 M NaCl <i>ad</i> 100 ml H <sub>2</sub> O dest.

**TBS-T:** 8 g NaCl  
2,42 g Tris  
0,1 ml Tween 20  
ad 1 l H<sub>2</sub>O dest.  
pH 7,6

**5%ige Milch:** TBS-T  
5% Magermilchpulver

Die Gesamtproteinkonzentration jedes Lysats wurde im BCA-Assay (de.: Bicinchoninsäure, engl.: *bicinchoninic acid*) gemessen. Dieser Assay nutzt die Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>1+</sup> durch Proteine im alkalischen Medium (Biuret-Reaktion). Das führt zur Chelatbildung eines Kupferions mit zwei Bicinchoninsäuremolekülen (BCA) und des daraus entstehenden und messbaren Farbumschlags von grün nach rotviolett. Die Bildung der wasserlöslichen Chelatkomplexe ist beinahe linear zur Proteinkonzentration und lässt in einer Messung bei 562 nm Extinktionsspektrum die Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteins gemessen an einer Standardkurve mit bekannten Proteinkonzentrationen zu (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific).

Zum Blotten wurden 30 µg Gesamtprotein aus den Gewebelysaten (Rückenmark der Mäuse, mehr dazu unter 2.2.2.7) bzw. 10 µg aus den Zellkulturlysaten und 50 µl 6xSDS-Puffer eingesetzt anschließend auf 300 µl mit TEN-Puffer aufgefüllt und 5 min bei 95°C gekocht. Mit Unterdruck wurden die Proben im Dot/Slot-System auf eine Nitrozellulosemembran gesogen. Im Anschluss wurden 300 µl H<sub>2</sub>O dest. nachpipetiert und ebenfalls durch die Membran gesogen. Die Membran wurde kurz mit TBS-T abgespült, 1 Std. bei Raumtemperatur mit 5% Magermilchpulver in TBS-T geblockt und über Nacht bei 4°C bei einer Verdünnung von 1:1000 mit dem polyklonalen SOD-100 Antikörper von Enzo Life Sciences in 5%iger Milch inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen, 1 Std. mit dem HRP (*horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase) gekoppelten Zweitantikörper von Santa Cruz inkubiert und erneut dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Zum Entwickeln wurde für eine Minute das ECL (*enhanced chemiluminescent*) von Thermo Scientific, mit darin enthaltenem Substrat der HRP, Luminol, auf die Membran gegeben. Die Membranen der Zellkulturproben wurden im Imager unter Messung der Chemilumi-

neszenz fotografiert. Mit den Membranen der Rückenmarkproben wurden Filme belichtet und in einer Entwicklermaschine entwickelt. Diese Filme wurden zwecks digitaler Analysen eingescannt. Zur Quantifizierung der Proteinsignale wurde in ImageJ ([imagej.nih.gov](http://imagej.nih.gov)) der Hintergrund subtrahiert, das Bild farblich invertiert und die Integrationsdichte gemessen. Um die Versuche untereinander zu vergleichen wurde jeweils das Verhältnis aus Pellet zu Überstand gebildet.

### 2.2.1.6 Western Blotting

**Elektrophoresegel 12%:** 3,4 ml H<sub>2</sub>O dest.  
2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8  
100 µl 10% SDS  
4 ml Acrylamid 37,5:1  
70 µl 10% APS  
16 µl TEMED

**Stackergel:** 2 ml H<sub>2</sub>O dest.  
840 µl 0,5 M Tris-HCl pH 6,8  
33,4 µl 10% SDS  
440 µl Acrylamid 37,5:1  
70 µl 10% APS  
16 µl TEMED

**6xSDS-Sample-Puffer:** 7 ml 4xTris-HCl/SDS, pH 6,8  
3 ml Glycerin  
1 g SDS  
0,93 g DTT  
1,2 mg Bromphenolblau

**TEN-Puffer:** 1 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0  
1 ml 100 mM EDTA pH 8,0  
2 ml 5 M NaCl  
*ad* 100 ml H<sub>2</sub>O dest.

---

<b>TBS-T:</b>	8 g NaCl 2,42 g Tris 0,1 ml Tween 20 <i>ad</i> 1 l H <sub>2</sub> O dest. pH 7,6
<b>5%ige Milch:</b>	TBS-T 5% Magermilchpulver
<b>Ponceau-S:</b>	0,25 g Ponceau-S 1,25 ml konzentrierte Essigsäure <i>ad</i> 250 ml H <sub>2</sub> O dest.
<b>Elektrophorese-Puffer:</b>	25 mM Tris 0,19 M Glycin 0,1% SDS <i>ad</i> 1 l H <sub>2</sub> O dest.
<b>Transferpuffer:</b>	25 mM Tris 0,19 M Glycin 20% Methanol <i>ad</i> 1 l H <sub>2</sub> O dest.

Vorbereitend für den Western Blot wurden die Zellysate wie vor dem Dot Blot mit dem BCA-Assay auf ihren Gesamtproteingehalt hin gemessen. Die 12%igen Elektrophoresegele wurden mit 20 µl Probe bestehend aus 8 µg Gesamtprotein, 6xSDS-Sample-Puffer, aufgefüllt mit TEN-Puffer, beladen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden über 1,5 Std. bei 100 V auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Übertragung der Proteine auf die Membran wurde mit Ponceau-S kontrolliert. Nach einem Blockschritt von einer Stunde in 5%iger Magermilchpulversuspension wurde die Membran über Nacht bei 4°C bei einer Verdünnung von 1:1000 mit dem polyklonalen SOD-100 Antikörper von Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland) in 5%iger Milch inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran 1 Std. mit dem HRP (*horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase) gekoppelten Zweitantikörper von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)

inkubiert und dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Zum Entwickeln wurde das Pierce ECL Western Blotting Substrate (Rockford, IL, USA) eingesetzt und die Filme in einem AGFA Curix 60-Entwickler entwickelt.

## **2.2.2 Tierexperimentelle Untersuchung**

### **2.2.2.1 Versuchsdesign**

Neben der Zellkultur wurde die Wirksamkeit von anle138b als antiaggregative und neuroprotektive Substanz im Tierversuch an ALS-Modell-Mäusen untersucht. Die neuroprotektive Wirkung wurde durch Quantifizierung von Motoneuronen in immunhistochemisch gefärbten Kryoschnitten des Rückenmarks der Versuchstiere beleuchtet. Die Frage nach der antiaggregativen Wirkung von anle138b sollten analog zu den Versuchen mit der Zellkultur semiquantitative Analysen der SOD1 in Rückenmarklysaten beantwortet werden.

Der tierexperimentelle Versuch wurde auf Antrag beim Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit am 13.08.2010 unter dem Aktenzeichen 10/0097 gemäß §8 Absatz 1 Tierschutzgesetz genehmigt.

### **2.2.2.2 Genotypisierung und Auswahl der Mäuse**

Für die Versuche kamen Weibchen der *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäuse aus der Zucht der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen zum Einsatz. Ihren Ursprung hat diese Zuchtlinie in kommerziell erworbenen Mäusen der Firma Jackson Laboratory in Bar Harbor, ME, USA.

Die transgenen Weibchen sind unfruchtbar. Somit müssen zur Erhaltung der Zucht transgene *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Männchen mit Wildtyp-Weibchen verpaart werden. Die F1-Generation enthält nach Mendel statistisch 50% transgene Tiere. Um den Genotyp der Mäuse zu bestimmen, wurde den Jungtieren im Alter von drei Wochen von den Tierpflegern der ZTE eine 0,5 cm lange Schwanzbiopsie entnommen. Die Genotypisierung wurde freundlicherweise durch Frau Christine Poser (BTA) durchgeführt. In einem Alter von 35 bis 40 Tagen wurden die Weibchen im Versuch eingesetzt.

### 2.2.2.3 Versuchsgruppen

Für die Rückenmarklysate wurden Mäuse in sechs Altersgruppen zu jeweils acht transgenen Tieren eingesetzt. Jeweils die Hälfte jeder Gruppe wurde mit Verumfutter, versetzt mit anle138b, und die andere Hälfte mit Placebofutter gefüttert (Tabelle 2). Die Startzeitpunktgruppe im Alter von 45 Tagen, bestehend aus vier Tieren, wurde nur mit Placebofutter gefüttert. Für die Gruppe im Endstadium wurden klare Abbruchkriterien definiert (siehe 2.2.2.4). Nach Feststellen dieser Kriterien wurden die Mäuse unabhängig vom Alter aus Tierschutzgründen getötet und als präterminale Gruppe definiert. Parallel zur präterminalen Gruppe wurden vier Wildtyp-Mäuse präpariert, um die Verteilung der SOD1 in nicht betroffenen Tieren zu zeigen.

Alter in Tagen	45	70	85	100	120	präterminal	Wildtyp
Verumfutter		Gruppe 70d	Gruppe 85d	Gruppe 100d	Gruppe 120d	Gruppe präterminal	
Placebofutter	Gruppe 45d	Gruppe 70d	Gruppe 85d	Gruppe 100d	Gruppe 120d	Gruppe präterminal	Gruppe wt

**Tabelle 2: Versuchstiergruppen der Rückenmarklysate (je vier Tiere)**

In jeder Versuchsgruppe im bestimmten Alter und mit einer bestimmten Futterart (Verum bzw. Placebo) waren vier Tiere.

Für die Immunhistochemie zur Quantifizierung der Motoneurone wurden 23 transgene Mäuse eingesetzt und zur Hälfte jeweils mit Placebo- und Verumfutter gefüttert (Tabelle 3).

alle 100 Tage alt	Anzahl der Tiere (alle transgen)
Verumfutter	10
Placebofutter	13

**Tabelle 3: Versuchstiergruppen der immunhistochemischen Untersuchung**

## 2.2.2.4 Abbruchkriterien – präterminale Gruppe

Als Abbruchkriterien dienten der Gewichtsverlust oder der Verlust motorischer Fähigkeiten der transgenen Tiere in einem bestimmten Ausmaß wie in den folgenden Absätzen ausgeführt. Beim Auftreten der Kriterien wurden die Mäuse, wie im Folgenden beschrieben (Absatz 2.2.2.6), in Narkose gelegt und präpariert.

### 2.2.2.4.1 Gewichtsverlust

Bei Gewichtsverlust von über zehn Prozent des Ausgangsgewichts innerhalb einer Woche wurde das Gewichtsverlustkriterium als positiv gewertet.

### 2.2.2.4.2 Verlust motorischer Fähigkeiten

Die motorischen Fähigkeiten wurden anhand zweier Parameter erfasst.

(1) Sank ihre maximale Laufleistung um mehr als zehn Prozent, galt dieses Kriterium als positiv (Gurney *et al.* 1996).

(2) Konnten sich die Mäuse innerhalb von zehn Sekunden nicht mehr aus der Seitenlage, in die sie der Versuchsleiter brachte, auf ihre vier Pfoten aufrichten, galt dieses Kriterium ebenfalls als positiv (Gurney *et al.* 1996).



**Abbildung 5: *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Maus in Seitenlage**

Fotografie freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stella Thyssen (Thyssen 2012).

Die Unfähigkeit der Maus sich aus dieser Lage zurück in ihre Ausgangsposition auf vier Pfoten zu drehen zeigte das Endstadium der Erkrankung an und war als Ausschlusskriterium definiert (Abbildung 5).

## 2.2.2.5 Rahmenbedingungen der Tierhaltung

### 2.2.2.5.1 Versuchsraum

Der Versuchsraum von etwa 10 qm Größe befindet sich in der eigens dafür eingerichteten Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen. In dem fensterlosen Raum herrschen konstante, definierte Bedingungen mit 22°C (+/-2°C) Raumtemperatur, 35% (+/-5%) Luftfeuchtigkeit und einer Zeitschaltuhr für die Beleuchtung im zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus (7 bis 19 Uhr hell und 19 bis 7 Uhr dunkel). Die nachtaktiven Mäuse waren somit in ihrem Tagesrhythmus ungestört.

### 2.2.2.5.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden zu viert bis zu sechst in Makrolonkäfigen vom Typ II lang gehalten (ähnlich der unten stehenden Abbildung 6). Als Einstreu erhielten sie entstaubtes und entkeimtes Weichholzgranulat (LIGNOCEL® FS-14, J. Rettenmaier & Söhne) und Holzwolle (TAPVEI®, PM90L/2R, Aspen Nesting Material) als Nestmaterial.



**Abbildung 6: Käfig mit Streu, Streu, Häuschen und Laufrad mit Sensor**

Hier ist ein Einzelkäfig fotografiert. Fotografie freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stella Thyssen (Thyssen 2012).

Der Käfiginhalt wurde wöchentlich vom Tierpflegepersonal gewechselt und der Käfig gereinigt. Futter und Leitungswasser in speziellen Vorrichtungen stand den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung.



**Abbildung 7: Vorrichtung zur Futter- und Wasserversorgung im Käfig**

Fotografie freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stella Thyssen (Thyssen 2012).

Das Futter wurde eigens für diesen Versuch von der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland) bezogen.

Inhaltsstoffe	Zusatzstoffe (pro kg)
22% Rohprotein	Vitamin A 25000 IE/IU
4,5% Rohfett	Vitamin D <sub>3</sub> 1500 IE/IU
3,9% Rohfaser	Vitamin E 120 mg
6,7% Rohasche	Vitamin K <sub>3</sub> 20 mg im Futter ohne Medikament oder 5 mg im Futter mit Medikament (anle138b)
34,9% Stärke	Kupfer 5 mg
5,2% Zucker	

**Tabelle 4: Inhalts- und Zusatzstoffe des Mäusefutters**

Ein Tierarzt, die Versuchsleitung und das Tierpflegepersonal sorgten stets für eine artgerechte Haltung der Tiere und überwachten ihre Gesundheit.

### **2.2.2.6 Perfusion und Präparation der Mäuse**

Vor dem Eingriff erfolgte die tiefe Anästhesie mit intraperitonealer Injektion von 1 ml Ketamin und Xylacin im Verhältnis von 3:1. Die Narkosetiefe wurde mit dem Zwischenzehenreflex an den Hinterläufen und Vorderläufen überprüft, der negativ sein musste, bevor ein Schnitt angesetzt wurde. Vor der Rückenmarkpräparation wurden die Mäuse für die Lysate mit 20 ml eisgekühlter PBS-Lösung und für die Immunhistochemie zusätzlich mit 20 ml 4% PFA in PBS, ebenfalls eisgekühlt, mit Hilfe einer peripheren Venenkanüle (18 G) perfundiert und entblutet. Die PBS-Lösung mit einem pH von 7,4 soll sicherstellen, dass das perfundierte Gewebe keinem osmotischen Druck ausgesetzt wird. Die Zugabe von 4% PFA dient der Fixierung und damit dem Erhalt der Gewebestruktur und der Antigenität als Voraussetzung für eine immunhistochemische Untersuchung.

Den narkotisierten Mäusen wurde die vordere Thoraxwand mit Hilfe einer kleinen F.S.T.-Schere herausgetrennt, das Herz im linken Ventrikel mit einer herkömmlichen peripheren Venenkanüle von apikal punktiert und das rechte Atrium eröffnet. Die Perfusion des großen Blutkreislaufs erfolgte mit leichtem Druck auf den Kolben einer 5 ml Spritze. Anschließend wurde von dorsal mit Hilfe von Pinzette, Skalpell und Schere das Rückenmark freipräpariert und für die Lysate direkt bei -80°C im 15-ml-Falcon-Tube eingefroren. Für die Immunhistochemie wurde das Rückenmark über Nacht bei 4°C in 4% PFA in PBS und anschließend für 24 Std. in 30% Succrose in destilliertem Wasser gelagert und erst anschließend bei -80°C eingefroren.

### **2.2.2.7 Lyse der Rückenmarkpräparate für die Dot Blot-Analysen**

Das Rückenmarkpräparat wurde vorerst in 500 µl TEN-Puffer mit Proteaseinhibitor in 2 ml Schraubröhrchen aufgenommen. Es wurden je Röhrchen zehn Keramikugeln mit einem Durchmesser von 1,4 mm hinzugegeben und im Homogenisator (Bertin Technologies) 2x35 sec homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension 1:1 mit TEN-Puffer samt Proteaseinhibitor und 1% NP-40 vermischt und in Beckman Microfuge Tubes überführt. Der Zentrifugationsassay ist unter Lyse und Detergensextraktion der SOD1-Aggregate (Absatz 2.2.1.4) bereits beschrieben. Davon abweichend

wurde das Pellet der Rückenmarklysate jeweils in 1 ml entsprechenden Puffer re-suspendiert.

### **2.2.2.8 Dot Blot der Rückenmarklysate**

Der Dot Blot wurde bereits weiter oben für die Zellkultur beschrieben (Absatz 2.2.1.5). Das Protokoll wurde ebenso auf die Rückenmarklysate angewendet.

### **2.2.2.9 Immunhistochemie**

Die *Intumescentia lumbalis* des fixierten und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Rückenmarks wurde am Cryotom in  $30\ \mu\text{m}$  dicke Schichten geschnitten und in PBS aufgenommen. Pro Tier wurden 50 Schnitte angefertigt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Jeder fünfte Schnitt wurde für die immunhistochemische Färbung vorerst  $3 \times 5$  min in  $0,1\ \text{M}$  TBS gewaschen. Um die endogene Peroxidase zu blocken, wurden die Schnitte 5 min in  $0,1\ \text{M}$  TBS mit 10% Methanol und 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert. Nach dem anschließenden Waschen wurden die Schnitte zur Vorbereitung der Erstantikörperinkubation mit 10% NGS in  $0,1\ \text{M}$  TBS geblockt und im Anschluss 24 Std. bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit dem polyklonalen rabbit anti ChAT-Antikörper (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Nach dem anschließenden weiteren Waschschrift wurden die Schnitte für 60 min bei RT mit dem biotinylierten anti-rabbit-Antikörper (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), gelöst in  $0,1\ \text{M}$  TBS + 2% NGS, inkubiert und anschließend erneut in  $0,1\ \text{M}$  TBS gewaschen. Jetzt wurde das Vectastain Elite ABC Kit eingesetzt (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Dieses nutzt den biotinylierten Zweitantikörper als Bindungsstelle für Avidin (Avidin-Biotin-Bindung), das selbst wiederum an biotinylierte Meerrettichperoxidase gebunden ist. Dabei entsteht ein Signalmultiplikatoreffekt. Als Indikator wurde das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu der Meerrettichperoxidase in Form des DAB Kits (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für eine Inkubationszeit von 7 min zugegeben. Das führt zur Braunfärbung der  $\alpha$ -motoneuronalen ChAT-Epitope. Dieser Arbeitsschritt erfolgte aufgrund der hohen Kanzerogenität von DAB in Schutzkleidung unter dem Abzug. Die gefärbten Schnitte wurden jetzt in drei Schritten in destilliertem Wasser gewaschen und nach Aufziehen auf Superfrost Objektträger für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Zuletzt erfuhren die Schnitte eine Entwässerungsreihe mit 70%, 90%, 95% Ethanol und schließlich Xylol für jeweils 5 min.

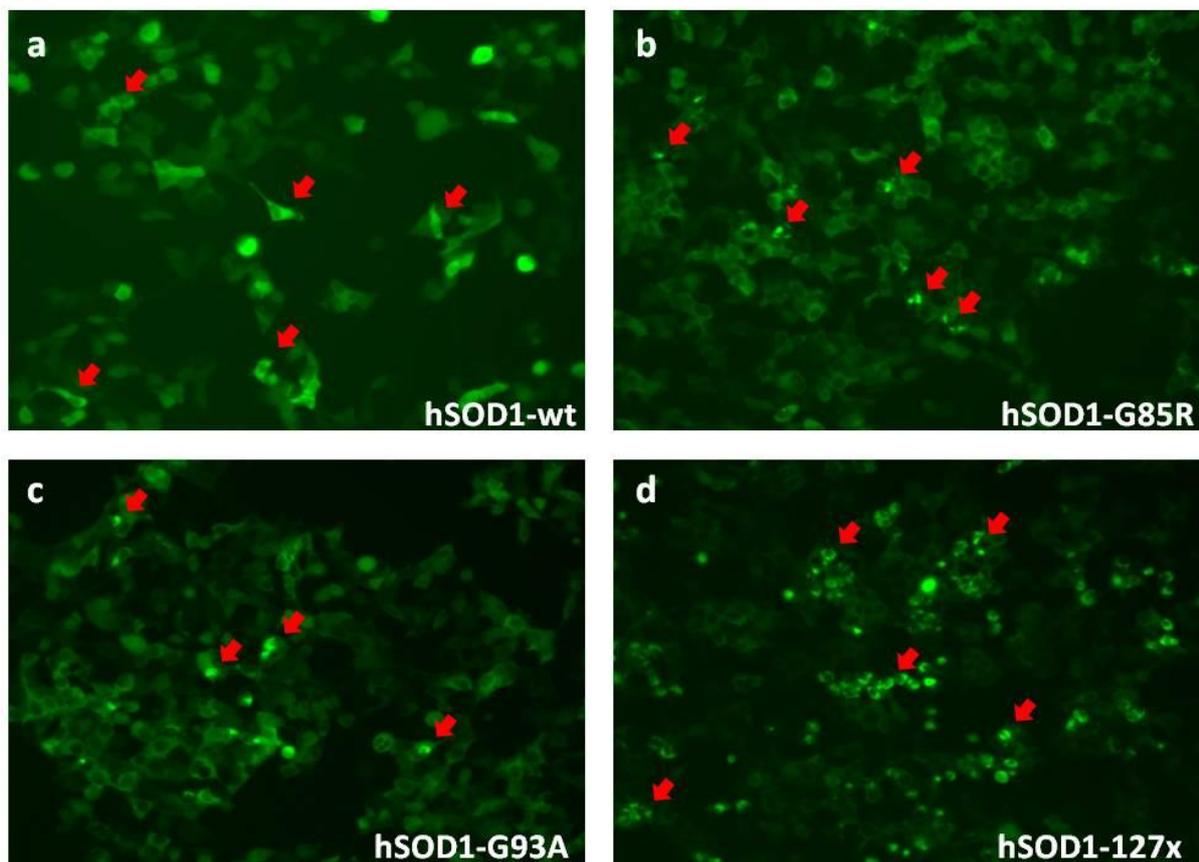
### 2.3 Statistische Methoden

Zur Auswertung der Versuchsdaten wurden die Statistiksoftware Statistica Version 10 für statistische und einige grafische Analysen der Firma StatSoft (Tulsa, OK, USA) eingesetzt. Die Durchführung der Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Christian Röver aus der Abteilung Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Prof. Tim Friede. Die Diagramme wurden mit dem Excel-Programm, Version 2003 der Firma Microsoft (Redmond, WA, USA) angefertigt. Spezifische Tests und Analysen sind im Absatz **3. Ergebnisse** innerhalb der jeweiligen Beschreibungen erwähnt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Kontrolle des Transfektionserfolgs

Nach 12-stündiger Inkubation der HEK293-Zellen mit dem Transfektionsmedium wurde der Transfektionserfolg unter einem Fluoreszenzmikroskop gesichert (Abbildung 8). In den Kontrollaufnahmen fällt die homogene Verteilung des GFP-Signals im Zytosol der hSOD1-wt-transfizierten Zellen auf. Die Mutanten imponieren allesamt mit konzentrierten GFP-Signalen, die an Proteinaggregate denken lassen.

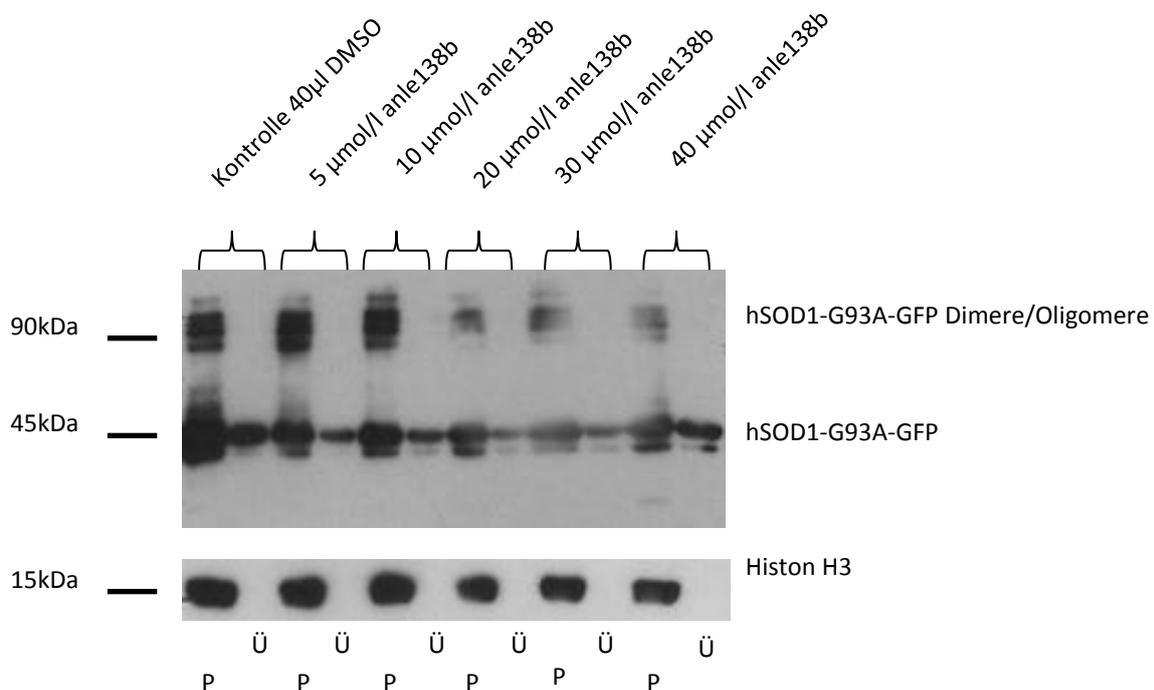


**Abbildung 8: HEK293-Zellen nach Transfektion mit GFP-getaggten hSOD1-Konstrukten**

Die roten Pfeile bezeichnen exemplarisch die hSOD1. a. homogene Verteilung der hSOD1-wt im Zytosol, b. c. d. neben homogenen GFP-Signalen sind auch Verdichtungen (rote Pfeile) der GFP-hSOD1-G85R, -G93A und -127X als Hinweis auf Aggregate zu sehen.

### 3.2 Verdünnungsversuche

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die anle138b-Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$ , die im Versuch zur Bioverfügbarkeit im Gehirn der Mäuse zu messen war (Wagner *et al.* 2013), *in vitro* ebenfalls einen antiaggregativen Effekt auf in HEK293-Zellen überexprimiertes hSOD1-G93A zeigt. Zur Testung wurden 5, 10, 20, 30 und 40  $\mu\text{mol/l}$  neben einer DMSO-Kontrolle eingesetzt. Nach Proteinauftrennung im Western Blot (Abbildung 9) und anschließend semiquantitativer Analyse mit densitometrischer Messung der Pellet (P)- und Überstandbanden (Ü) wurde der Quotient (P/Ü) aus diesen gebildet.



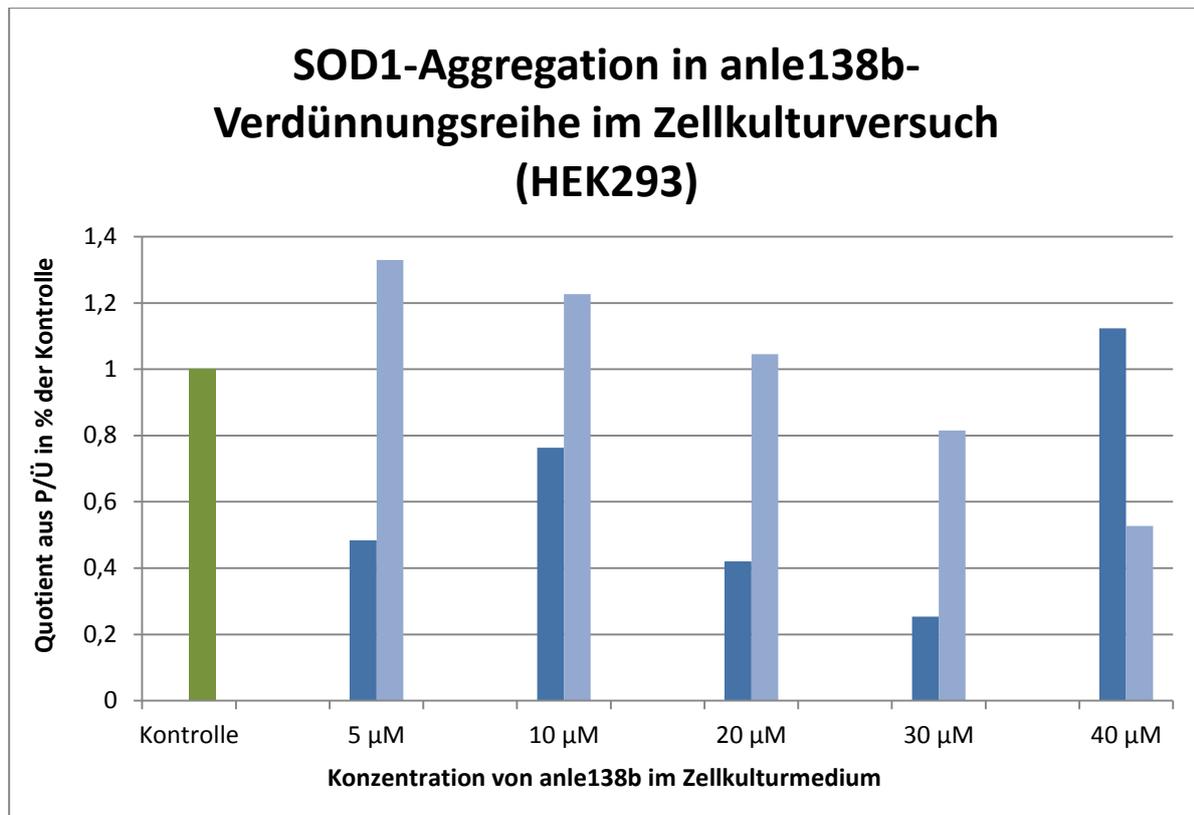
**Abbildung 9: Western Blot aus hSOD1-G93A-transfekzierter Zellkultur mit unterschiedlichen Konzentrationen anle138b zur Dosisfindung**

Verteilung zwischen den löslichen (Ü) und Detergens (SDS, NP-40) unlöslichen (P) Fraktionen der G93A-hSOD1 unter Behandlung der Zellen mit 5, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{mol/l}$  anle138b und 40  $\mu\text{l}$  DMSO als Kontrolle. Aufgetragen wurden 8  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein der Lysate der mit hSOD1-Plasmiden transfizierten HEK293 Zellkultur. Zur Darstellung der hSOD1-Varianten wurde ein SOD1-Antikörper verwendet. Außerdem wurde zur Kontrolle des Zentrifugationsassays (Witan *et al.* 2008) und als Ladekontrolle das Histon H3 mit anti-Histon H3 visualisiert. Zur Darstellung im Balkendiagramm wurden die hSOD-G93A-Banden densitometrisch gemessen.

Der Quotient Pellet/Überstand (P/Ü) zeigt, wie hoch der aggregierte Anteil der SOD1 (Pellet) im Verhältnis zum gelösten Anteil (Überstand) ist. Jeder methodische Schritt, beginnend mit dem Ausplattieren der HEK293-Zellen bis zum Auftragen der Lysate zum Western Blotting, birgt trotz höchster Aufmerksamkeit bei der Durchführung Fehlerquellen, die die absolute SOD1-Menge beeinflussen können. Ferner ist nicht auszuschließen, dass die Plasmide abhängig von der SOD1-Mutante in unterschiedlichen Mengen exprimiert werden sowie unterschiedlich toxisch sind, sodass die Gesamt-SOD1-Menge, enthalten in den HEK293-Zellen, zwischen den Mutanten variiert. Diese Fragen waren nicht Gegenstand dieser Arbeit. Es sollte die antiaggregative Wirkung von anle138b und somit der Shift von der Detergens unlöslichen Fraktion in die lösliche unter Behandlung mit anle138b untersucht werden. Der Fehler beim Vergleich absoluter Mengen wird beim Vergleich von Quotienten vermieden.

Dieser Versuch wurde zweimalig durchgeführt und ergab in Summe den niedrigsten P/Ü-Quotienten (P=Pellet, Ü=Überstand) bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  (Abbildung 10). Daneben fällt im Western Blot (Abbildung 9) auf, dass bei der Lyse und in der Probenaufbereitung für den Western Blot Dimere und unterschiedlich große Oligomere der SOD1 in den Präzipitaten erhalten bleiben. Diese wurden bei der Quantifizierung mitberücksichtigt. Die Überstände sind frei von sonstigen Banden außer der SOD1 als Monomer. Das spricht dafür, dass im angewendeten Zentrifugationsassay tatsächlich ausschließlich lösliche SOD1-Fractionen im Überstand erscheinen. Wogegen die Präzipitate diverse Erscheinungsformen der SOD1-Quartärstruktur enthalten. Das Histon H3 wurde zur Ladekontrolle und als Qualitätskontrolle für den Zentrifugationsassay angefärbt. Das Histon H3 als Bestandteil eines Histon-Oktamers, das im Zellkern jeder eukaryoten Zelle vorkommt, setzt sich als Oktamer durch die Ultrazentrifugation im Pellet ab (Witan *et al.* 2008) und ist somit ein Indikator für die Pelletierung von Proteinpolymeren.

Im folgenden Balkendiagramm (Abbildung 10) sind die Quotienten P/Ü aus der densitometrischen Messung der hSOD1-G93A-Banden dargestellt.



**Abbildung 10: SOD1-G93A-Aggregation in anle138b-Verdünnungsreihe in zwei Zellkulturversuchen (HEK293-Zellen)**

Für 30 µmol/l zeigt sich in beiden Versuchen ein reduziertes Niveau für den Quotienten.

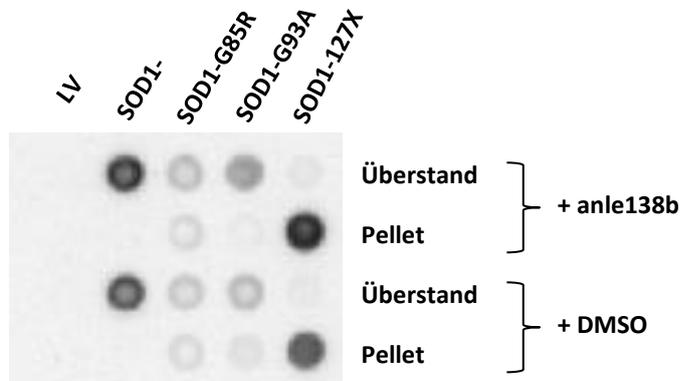
Balkendiagramm zu Quotienten der Detergens (SDS, NP-40) unlösliche SOD1-G93A aus den Pellets (P) zur löslichen SOD1-G93A aus den Überständen (Ü), P/Ü. Der Quotient der Kontrolle ist gleich 1 (grün) und die Quotienten aus zwei Versuchen (Versuch 1 dunkelblau, Versuch 2 hellblau) mit je 5, 10, 20, 30 und 40 µmol/l davon in Prozent. Auf der Abszisse sind die anle138b-Konzentrationen, auf der Ordinate die Prozentwerte der P/Ü-Quotienten aufgetragen.

Wie bereits erwähnt, zeigte sich in der Untersuchung von Wagner *et al.* zur Bioverfügbarkeit von anle138b bei Mäusen eine Konzentration von ca. 30 µmol/l=30 nmol/ml im Gehirn ca. fünf Stunden nach oraler Ein-Mal-Gabe von 5 mg anle138b (Wagner *et al.* 2013).

### 3.3 Wirkung von anle138b auf hSOD1 in Zellkultur

#### 3.3.1 Reduktion der Proteinaggregation unter anle138b in Zellkultur

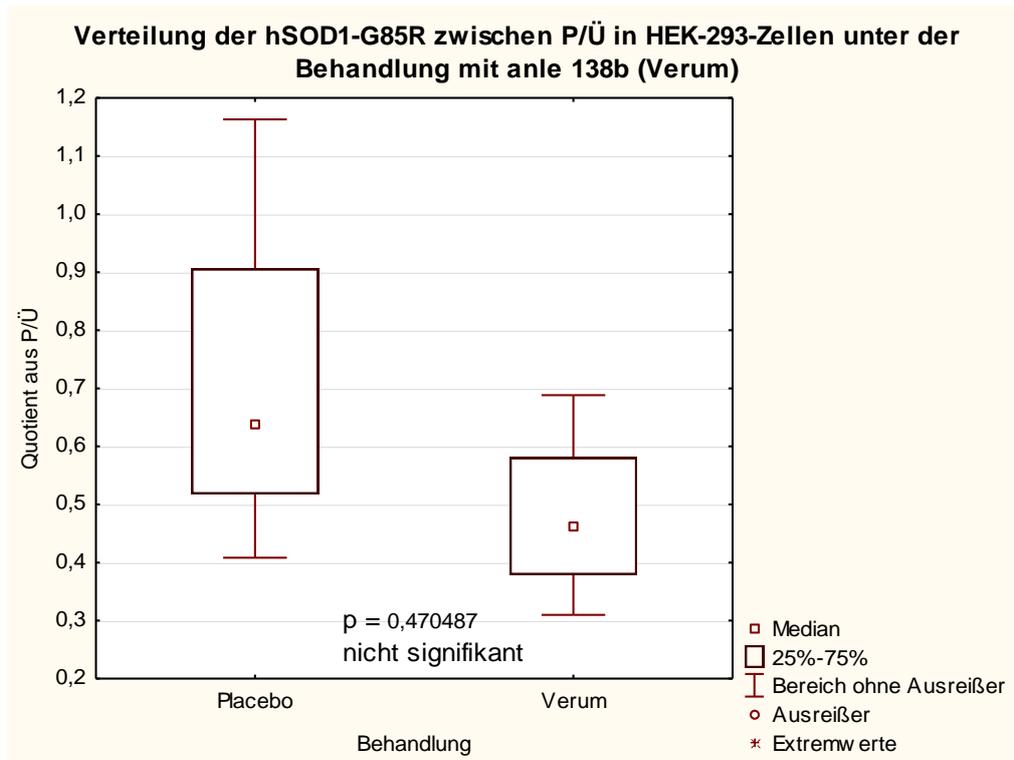
Unter Einsatz von 30  $\mu\text{mol/l}$  anle138b wurde in diesem Versuch die antiaggregative Wirkung auf die Mutanten G85R, G93A und 127X der hSOD1 in der HEK293-Zellkultur mittels Dot Blot untersucht (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Dot Blot aus Zellkulturlysaten zur semiquantitativen Bestimmung des Quotienten P/Ü**

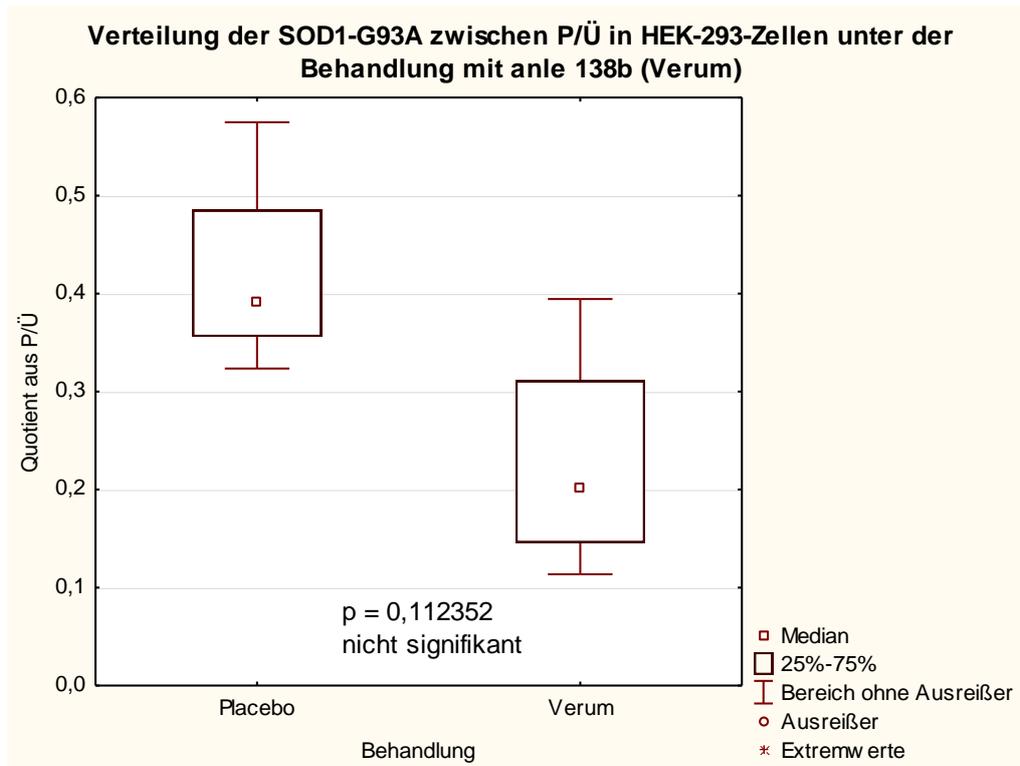
LV steht für Leervektor (Kontrolle). Verteilung zwischen den löslichen (Ü) und Detergens (SDS, NP-40) unlöslichen (P) Fraktionen der hSOD1 und ihrer Mutanten unter Behandlung der Zellen mit anle138b und mit DMSO. Aufgetragen wurden 30  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein der Überstände und Pellets von Lysate der mit hSOD1-Plasmiden und ihrer Mutanten transfizierten HEK293-Zellkultur. Zur Darstellung der hSOD1-Mutanten wurde ein SOD1-Antikörper verwendet. Die Dots wurden densitometrisch ausgemessen.

Die Dots wurden densitometrisch gemessen. Im Folgenden sind die entsprechenden Box Plot-Diagramme mit je vier Versuchen zur Verteilung von P/Ü für Placebo und Verum (anle138b) für die Mutanten G85R, G93A und 127X gezeigt (Abbildung 12, 13 und 14).



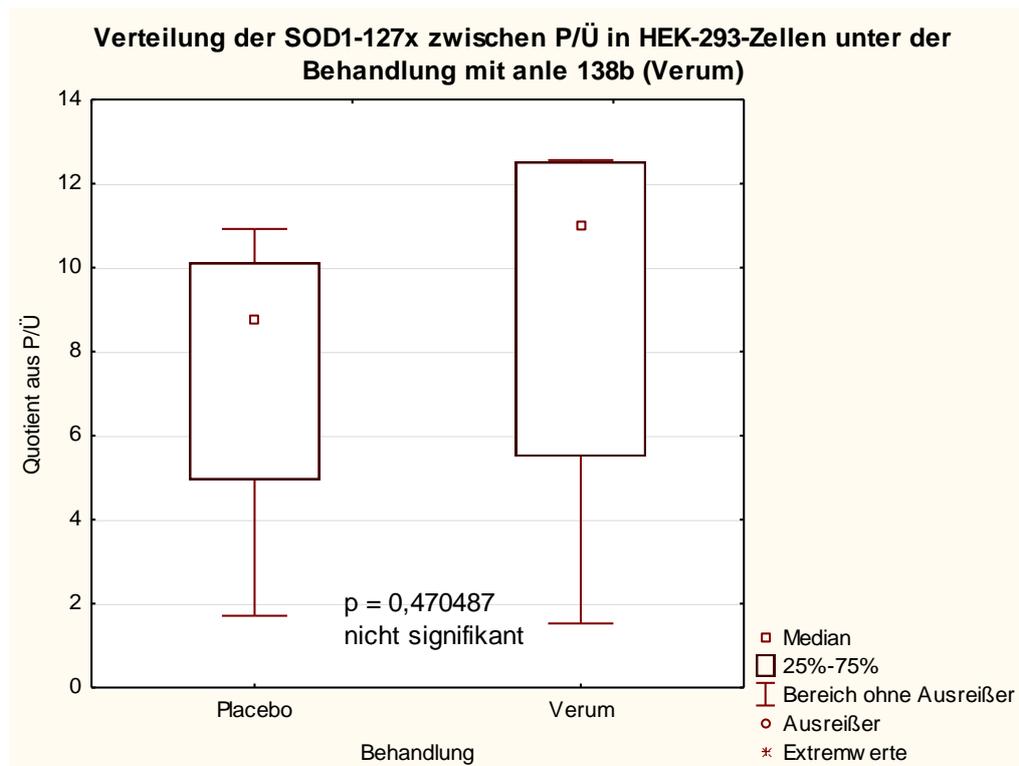
**Abbildung 12: Einfluss von anle138b auf die Aggregation von hSOD1-G85R in HEK293-Zellkultur**

Das Diagramm zeigt Box Plots zur Verteilung der Quotienten aus P/Ü (y-Achse) mit einer Reduktion des Quotienten unter Behandlung mit anle138b (Verum). Es wurden vier Versuche durchgeführt. Statistisch ist das Ergebnis nicht signifikant.



**Abbildung 13: Einfluss von anle138b auf die Aggregation von hSOD1-G93A in HEK293-Zellkultur**

Das Diagramm zeigt Box Plots zur Verteilung der Quotienten aus P/Ü mit einer Reduktion des Quotienten unter der Behandlung mit anle138b (Verum). Es wurden vier Versuche durchgeführt. Statistisch ist das Ergebnis nicht signifikant.



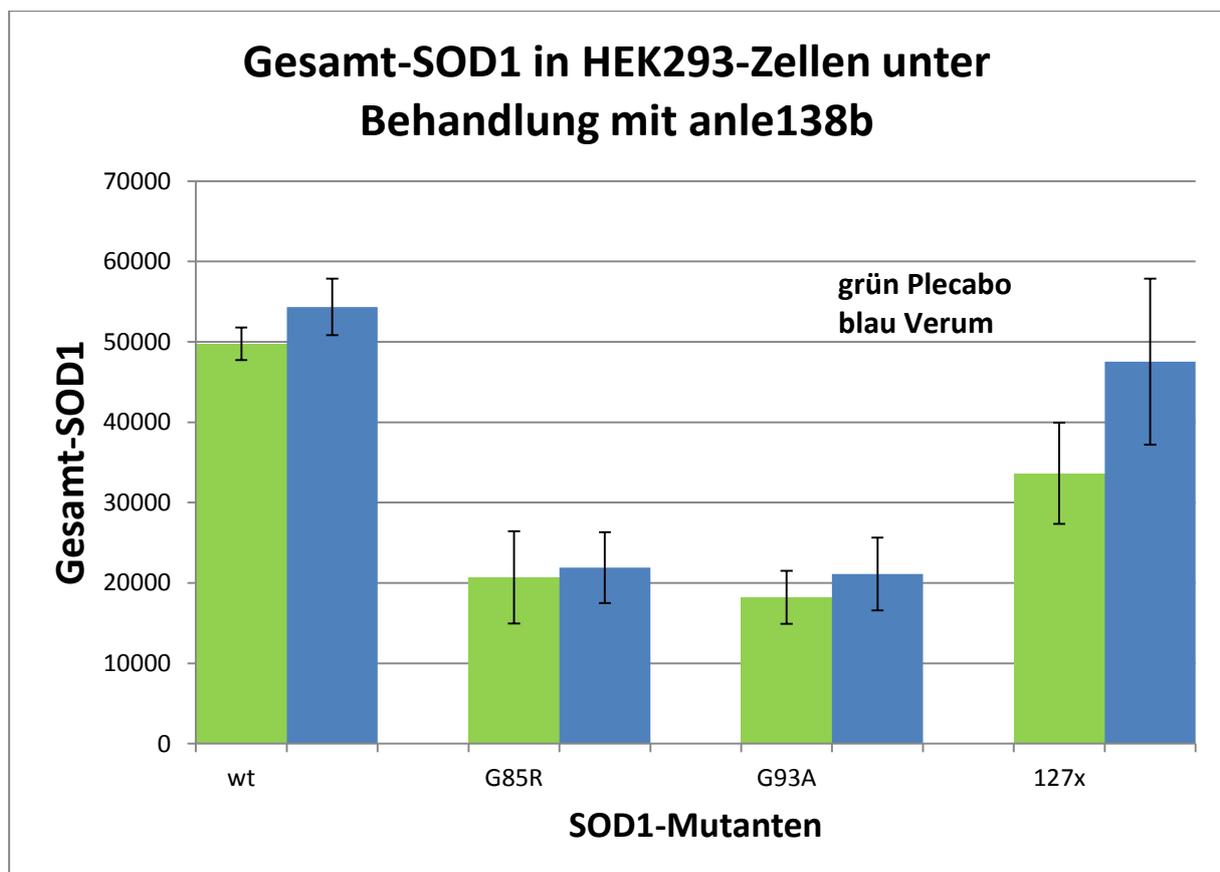
**Abbildung 14: Einfluss von anle138b auf die Aggregation von hSOD1-127X in HEK293-Zellkultur**

Das Diagramm zeigt Box Plots zur Verteilung der Quotienten aus P/Ü (y-Achse) mit einer Tendenz zum Anstieg des Quotienten unter der Behandlung mit anle138b (Verum). Es wurden vier Versuche durchgeführt. Statistisch ist das Ergebnis nicht signifikant.

Für die Mutanten G85R und G93A kann eine Verschiebung des P/Ü-Quotienten zu niedrigeren Werten gezeigt werden, die allerdings statistisch keine Signifikanz aufweist (Abbildung 12 und 13). Für die Mutante 127X hingegen ist der Effekt der Aggregatreduktion mit dieser Methode nicht nachzuweisen (Abbildung 14). Der Quotient P/Ü steigt sogar. Nebenbei ist aufgefallen, dass die Summe der P- und Ü-Signale, somit die gesamte lösliche und Detergens (SDS, NP-40) unlösliche hSOD1-Menge, unter der Behandlung von anle138b tendenziell zunimmt, was für einen Akkumulationseffekt spricht. Dieser *in vitro*-Versuch mit HEK293 und Überexpression von hSOD1 und ihren Mutanten wurde vier Mal durchgeführt. Die densitometrische Messung der SOD1-Signale wurde statistisch mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test untersucht.

### 3.3.2 Akkumulation der Gesamt-hSOD1 in HEK293 unter Behandlung mit anle138b

Zusätzlich zur Verteilung der SOD1 zwischen der löslichen und unlöslichen Fraktion wurden diese beiden Anteile zusammengelegt und so die Gesamtmenge der SOD1 je Mutante in Abhängigkeit von der Behandlung mit anle138b erfasst (Abbildung 15).



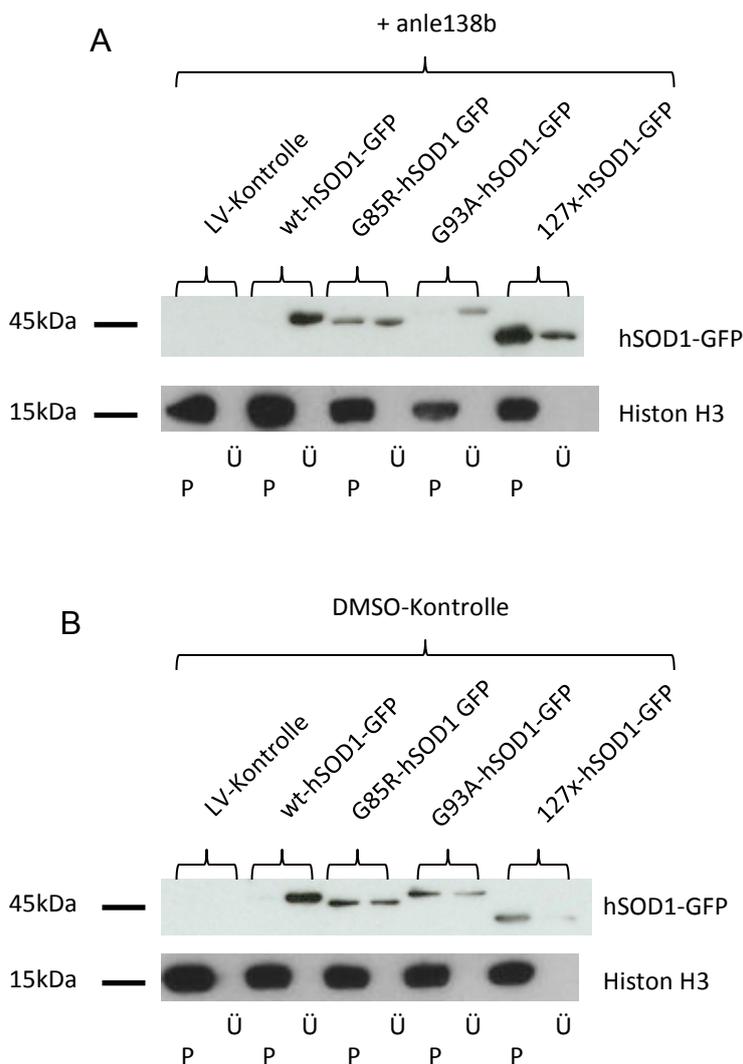
**Abbildung 15: Gesamt-SOD1 in HEK293-Zellen unter Behandlung mit anle138b**

Das Diagramm zeigt die gesamte SOD1-Menge (P+Ü) der Dot Blots mit einer Tendenz zur Zunahme der SOD1 unter der Behandlung mit anle138b (Verum, blau). Statistisch sind die Differenzen nicht signifikant (wt:  $p=0.1809$ ,  $n=4$ ; G85R:  $p=0.433$ ,  $n=4$ ; G93A:  $p=0.304$ ,  $n=4$ ; 127X:  $p=0.1505$ ,  $n=4$ ).

Tendenziell erhöht anle138b die SOD1-Menge in den HEK293-Zellen bei allen untersuchten Mutanten bis auf G85R, wobei die Unterschiede statistisch nicht signifikant sind.

### 3.3.3 Kontrolle der Ultrazentrifugation der Detergens-unlöslichen hSOD1-Aggregate

Zur Qualitätssicherung des Ultrazentrifugationsassays wurde im Western Blot der Zelllysate die hSOD1 und ihre Mutanten sowie das Histon H3 dargestellt (Abbildung 16). Die fehlenden Histon H3-Signale über den Überständen bestätigen die Qualität der Ultrazentrifugation. Das Histon H3 als Indikator für Proteinaggregate lässt sich nur im Pellet detektieren.



**Abbildung 16: Kontrolle des Ultrazentrifugationsassays**

In den Überstand-Proben lässt sich auf Höhe des Histon H3 keine Bande detektieren. A. Verteilung zwischen den löslichen (Ü) und Detergens unlöslichen (P) Fraktionen der hSOD1 und ihrer Varianten unter Behandlung der Zellen mit anle138b. Aufgetragen wurden 8 µg Gesamtprotein der Lysate der mit hSOD1-Plasmiden transfizierten HEK293-Zellkultur. Zur Darstellung der hSOD1-Varianten wurde

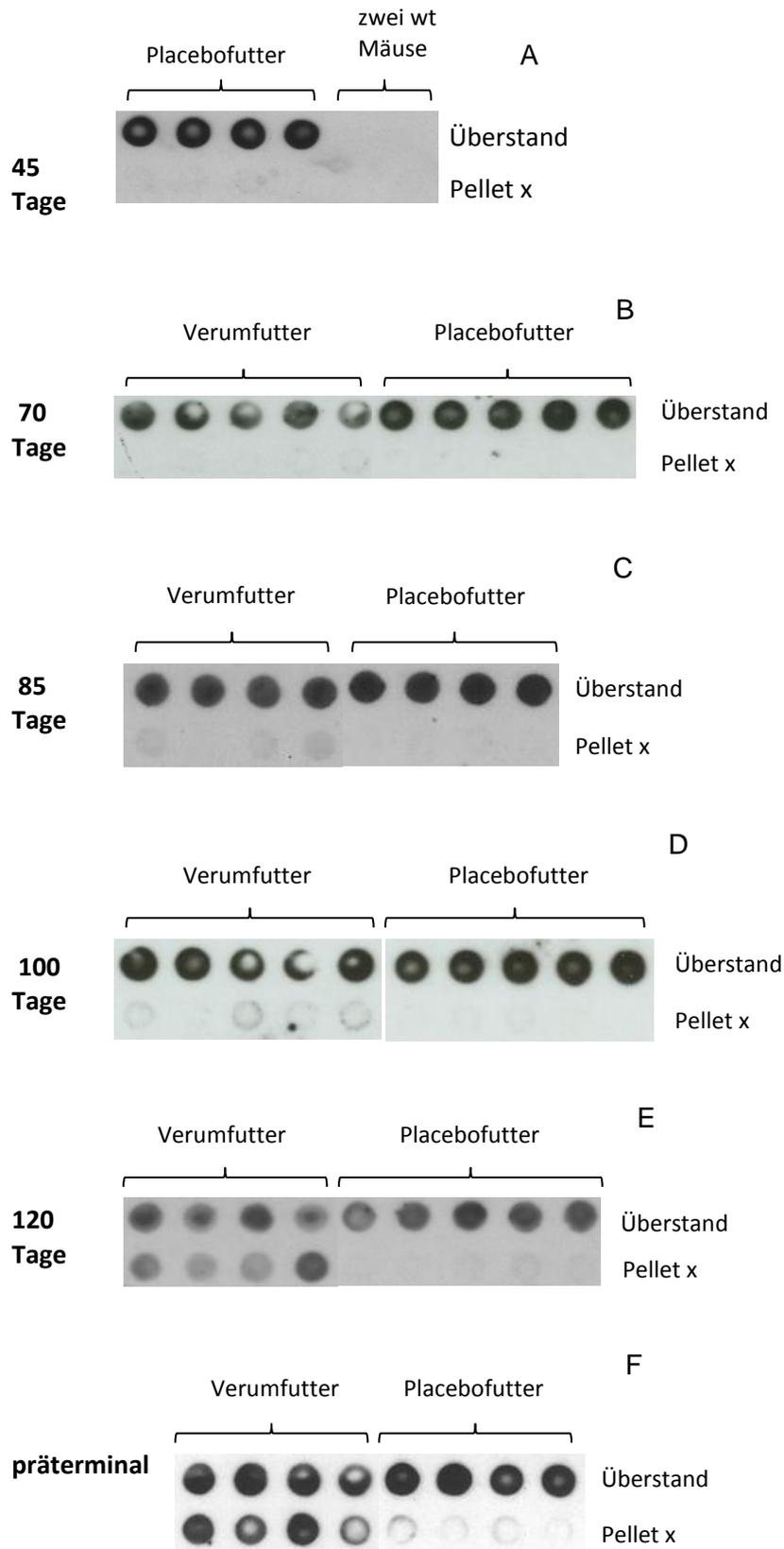
ein SOD1-Antikörper verwendet. Außerdem wurde zur Kontrolle des Zentrifugationsassays (Witan *et al.* 2008) und als Ladekontrolle das Histon H3 mit anti-Histon H3 visualisiert.

B. Verteilung zwischen den löslichen (Ü) und Detergens unlöslichen (P) Fraktionen der hSOD1 und ihrer Varianten unter Behandlung der Zellen mit DMSO als Kontrolle. Aufgetragen wurden 8 µg Gesamtprotein der Lysate der mit hSOD1-Plasmiden transfizierten HEK293-Zellkultur. Zur Darstellung der hSOD1-Varianten wurde ein SOD1-Antikörper verwendet. Außerdem wurde zur Kontrolle des Zentrifugationsassays (Witan *et al.* 2008) und als Ladekontrolle das Histon H3 mit anti-Histon H3 visualisiert. LV steht für Leervektor.

### **3.4 Wirkung von anle138b auf hSOD1 im Mausmodell**

#### **3.4.1 Exponentielle Akkumulation der SOD1-Aggregate im Rückenmark der *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäuse über die Lebensspanne unter Behandlung mit anle138b**

Zur Untersuchung von Verteilung der hSOD1 im Rückenmark der *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäuse zwischen der löslichen und Detergens unlöslichen Fraktion erhielten die Mäuse mit anle138b versetztes Futter (Verumfutter) und wurden jeweils in Gruppen von vier bis fünf Tieren zu den Zeitpunkten 45, 70, 85, 100, 120 Tage Mäusealter und im präterminalen Stadium präpariert und untersucht. Parallel zu jeder Gruppe mit Verumfutter wurde eine Gruppe mit Placebofutter untersucht. Die Rückenmarkpräparate wurden nach der Lyse im Dot Blot ausgewertet (Abbildung 17) und die Pixeldichte der SOD1-positiven Proteinsignale gemessen (Abbildung 18).

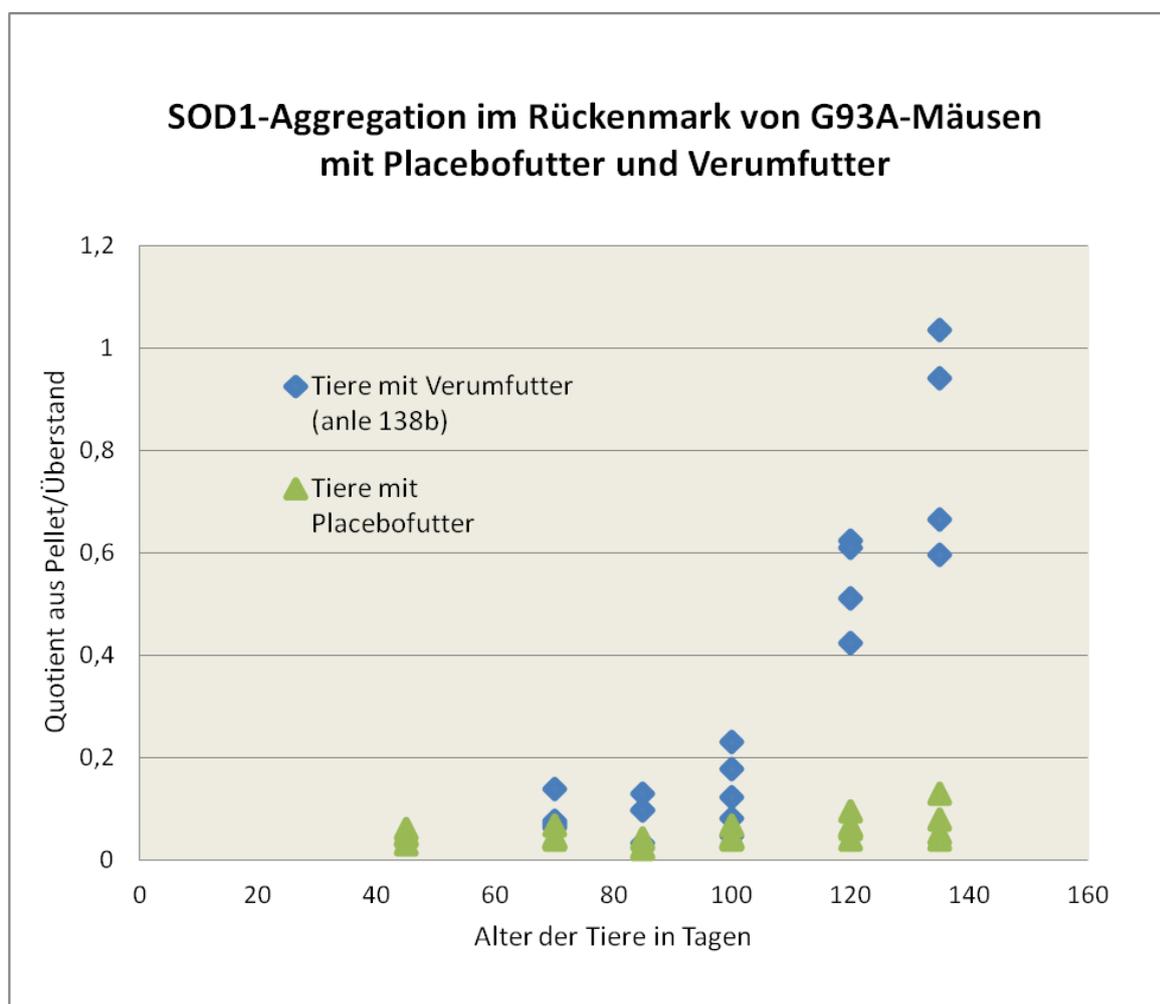


Beschreibung der Abbildungen auf der nächsten Seite

**Abbildung 17: Dot Blots aus Rückenmarklysaten transgener Mäuse zur semiquantitativen Bestimmung des Quotienten P/Ü**

Verteilung zwischen den löslichen (Ü) und Detergens unlöslichen (P) Fraktionen der überexprimierten *hSOD1-G93A* in *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäusen abhängig vom Alter. A zeigt unbehandelte Tiere im Alter von 45 Tagen und Proben zweier wt-Mäuse. Die endogene SOD1 der wt-Mäuse war in dem Versuch nicht zu detektieren (keine Proteinsignale sichtbar). B zeigt Proben von Tieren im Alter von 70 Tagen, C 85 Tage, D 100 Tage, E 120 Tage und F zeigt präterminale Tiere. Gegenüber gestellt in B bis F sind jeweils vier bis fünf Tiere mit Verumfutter (anle138b) und mit Placebofutter. Aufgetragen wurden 30 µg Gesamtprotein der Überstände und 150 µg der Pellets der Rückenmarklysate. Von den Pellets der präterminalen Tiere wurden 30 µg eingesetzt, da das Signal sonst im gesättigten Bereich war. Zur Darstellung der *hSOD1-G93A* wurde ein SOD1-Antikörper verwendet.

Die Quotienten aus Pellet/Überstand sind im folgenden Diagramm für jede Maus aller Gruppen aufgetragen (Abbildung 18).



**Abbildung 18: SOD1-Aggregation im Rückenmark von G93A-Mäusen mit Placebo- und Verumfutter (anle138b)**

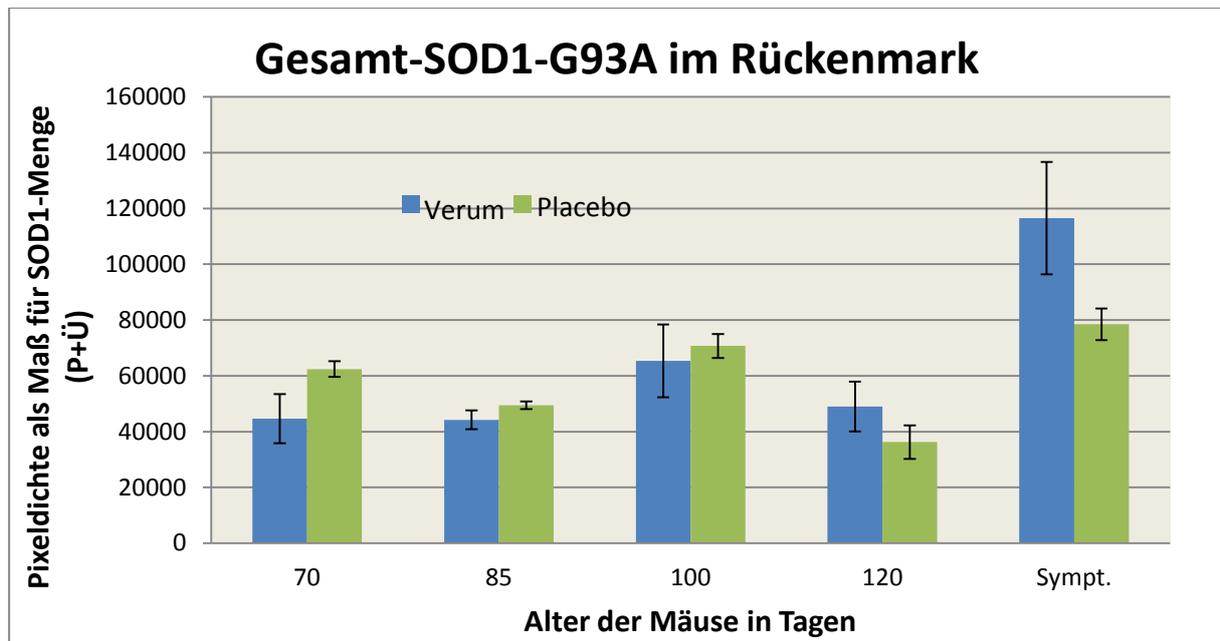
Auf der x-Achse ist das Alter der Tiere in Tagen, auf der y-Achse der Quotient Pellet/Überstand der densitometrischen Blot-Auswertungen aufgetragen. Es wurden sechs Gruppen (45, 70, 85, 100,

120 Tage und präterminal) von je vier bis fünf Tieren mit Verumfutter (blau) und Kontrollgruppen mit Placebofutter (grün) untersucht. Das Punktediagramm zeigt bei den Mäusen mit Verumfutter eine wesentlich stärker ausgeprägte Anreicherung der Proteinaggregate als in der Kontrollgruppe mit Placebofutter. Es lässt sich unter Behandlung mit Verumfutter mit fortschreitendem Alter eine exponentielle Zunahme der SOD1-Aggregation ablesen.

Das Punktediagramm zeigt bei den Tieren mit Placebofutter mit zunehmendem Alter eine leichte Anreicherung der Detergens unlöslichen SOD1-Anteile. Die SOD1-Aggregate bei den Tieren mit Verumfutter nehmen vom Beginn der Behandlung bis zu ihrem Tod gar annähernd exponentiell zu. Dieses Ergebnis steht im deutlichen Gegensatz zu den Ergebnissen der *in vitro*-Versuche und der Hypothese zu an-le138b als antiaggregative Substanz.

### **3.4.2 Gesamt-SOD1-G93A im Rückenmark der *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäuse**

Die Summen der densitometrisch erfassten Signale für die löslichen und Detergens unlöslichen Fraktionen ergab ebenfalls ein bemerkenswertes Ergebnis (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Gesamt-SOD1-G93A im Rückenmark der *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäuse mit Placebo- (grün) und Verumfutter (anle138b, blau) im Alter von 70 Tagen bis präterminal symptomatisch mit ca. 135 Tagen**

Für diese Darstellung wurden die Werte P und Ü addiert und über die vier bis fünf Tiere pro Altersgruppe gemittelt. Unter der Behandlung mit anle138b zeigt sich bei den jüngeren, asymptotischen Tieren eine reduzierte Menge an SOD1-G93A und bei Einsetzen der Symptome bei den älteren Tieren eine vermehrte Akkumulation von SOD1-G93A unter Behandlung mit anle138b im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Die Ergebnisse in den Gruppen 70 d und 120 d sind für das Signifikanzniveau  $p=0,05$  signifikant (70 d:  $p=0.0035$ ,  $n=5$ ; 85 d:  $p=0.0896$ ,  $n=4$ ; 100 d:  $p=0.209$ ,  $n=5$ ; 120 d:  $p=0.0295$ ,  $n=4$ ; Sympt.:  $p=0.0552$ ,  $n=4$ ).

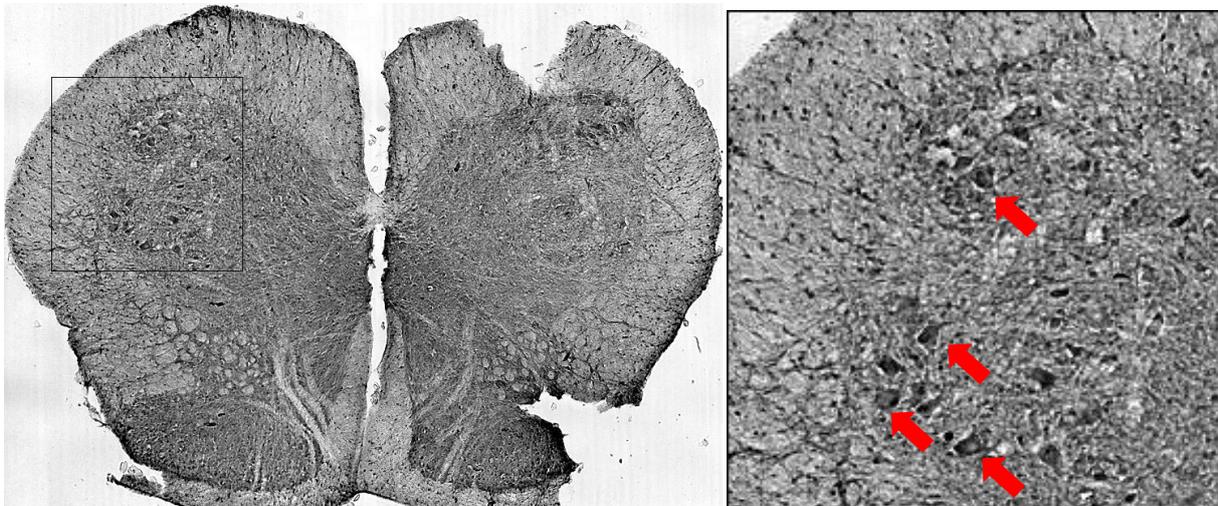
Im Alter von 70 Tagen weist die Gruppe mit Verumfutter (anle138b) eine signifikant geringere Menge Gesamt-SOD1 auf ( $p=0.0035$ ,  $n=5$ ). Auch im Alter von 85 und 100 Tagen ist dieser Unterschied noch vorhanden, allerdings nicht signifikant ( $p=0.0896$ ,  $n=4$  und  $p=0.209$ ,  $n=5$ ). Im Alter von 120 Tagen übersteigt nun die Gesamt-SOD1-Menge der Verum-behandelten Tiere die Menge der Placebotiere signifikant ( $p=0.0295$ ,  $n=4$ ). Präterminal übersteigt die SOD1-Menge bei der Verumgruppe die SOD1-Menge der Placebogruppe jedoch nicht signifikant ( $p=0.0552$ ,  $n=4$ ). Nimmt man hier einen Ausreißer der jeweils vier Tiere pro Gruppe heraus, ist auch dieser Unterschied signifikant ( $p=0.0099$ ,  $n=3$ ).

### 3.5 Anle138b ohne neuroprotektiven Effekt im Mausmodell

#### 3.5.1 Die immunhistochemische Färbung der $\alpha$ -Motoneurone der *Intumescentia lumbalis* zeigt keinen neuroprotektiven Effekt durch anle 138b

Ziel dieses Versuchs war, eine potentielle neuroprotektive Wirkung von anle138b auf die  $\alpha$ -Motoneurone des Vorderhorns im Rückenmark von ALS-Modellmäusen zu untersuchen.

Die immunhistochemische Färbung zeigte ChAT-positive und in ihrer Größe deutlich herausstechende Zellen im Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks der *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäuse (Abbildung 20).



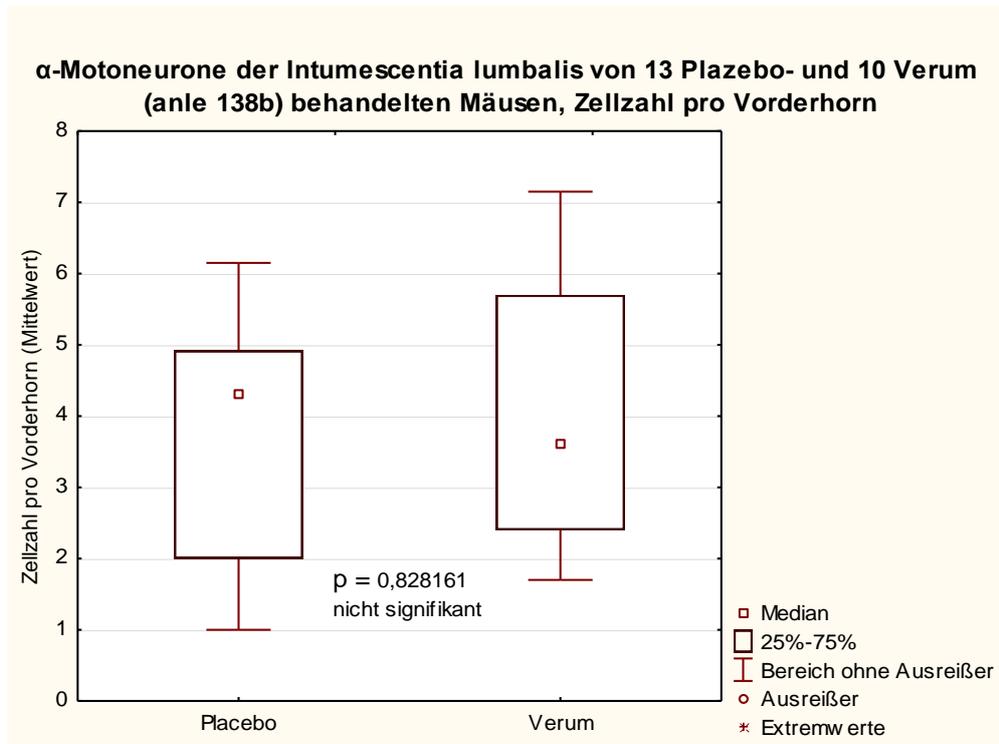
**Abbildung 20:** Rückenmarkschnitt der *Intumescentia lumbalis* einer *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Maus mit gefärbten  $\alpha$ -Motoneuronen (ChAT-positiv), im vergrößerten Ausschnitt markiert mit roten Pfeilen

Ebenfalls typisch für  $\alpha$ -Motoneurone ist die Anordnung in Zellverbänden. Vergleichbare Zellen waren im Hinterhorn nicht auszumachen. Ab einer Größe von  $400 \mu\text{m}^2$  wurden diese Zellen als  $\alpha$ -Motoneuron gewertet und in die Zählung eingeschlossen. Das Ergebnis der Zählung ist in folgender Tabelle dargestellt (Tabelle 5).

tg, Verum		tg, Placebo	
Maus Nr., im Versuch	$\alpha$ -Motoneurone pro Vorderhorn (Mittelwert aus 10 Schnitten)	Maus Nr., im Versuch	$\alpha$ -Motoneurone pro Vorderhorn (Mittelwert aus 10 Schnitten)
1	6,7	2	6,15
5	2,5	4	2
7	2,29	6	1,6
8	3,5	10	1
9	2,4	12	1,36
14	3,7	15	4,1
19	4,28	16	4,74
22	1,7	17	4,92
25	5,7	18	3
29	7,15	23	4,4
		24	5,11
		26	4,3
		28	5,3
<b>Mittelwert</b>	<b>3,992</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>3,690769231</b>

Tabelle 5: Mittelwerte der  $\alpha$ -Motoneuronzählungen

Pro Maus wurden zehn Schnitte gefärbt und die der Definition entsprechenden Zellen in je einem Vorderhorn gezählt. Für jedes Tier wurde dann ein arithmetisches Mittel pro Vorderhorn berechnet. Für beide Gruppen, Placebo und Verum, wurde sodann das arithmetische Mittel aus allen untersuchten Mäusen berechnet und ergab für die Verumgruppe rund 4,0 und für die Placebogruppe 3,7 Zellen pro Vorderhorn. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test herangezogen, wobei in der Verumgruppe 10 Tiere und in der Placebogruppe 13 Tiere berücksichtigt wurden. Das Ergebnis ist in folgendem Box Plot dargestellt (Abbildung 21). Die Zellzahl der Verum-behandelten Tiere ist nicht signifikant höher ( $p=0,83$ ,  $n=10$ ).



**Abbildung 21: Die Zählung der  $\alpha$ -Motoneurone im Rückenmark von *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäusen mit Placebofutter gegenüber Verumfutter (anle138b) zeigt keinen signifikanten neuroprotektiven Effekt ( $p=0,83$ ,  $n=10$ )**

## 4. Diskussion

### 4.1 Verdünnungsversuche

Die Verdünnungsversuche (Absatz 3.2, Abbildung 10) zeigten beim Mittelwert aus zwei Ansätzen bei 30  $\mu\text{mol/l}$  anle138b eine Reduktion des P/Ü-Quotienten gegenüber der Kontrolle mit DMSO. Diese Konzentration wurde auch in den Folgeversuchen eingesetzt. Die Banden des Histon H3 dienen neben der Ladekontrolle auch als Indikator der Pelletierung von Detergens unlöslichen Proteinanteilen aus dem Intrazellulärraum (Witan *et al.* 2009). So lassen sich in den Proben der Überstände (Ü) keine Banden darstellen. Dies belegt die Effizienz des verwendeten Verfahrens, bestehend aus Probenaufbereitung und Ultrazentrifugation, sodass davon auszugehen ist, dass sich alle nicht-löslichen Bestandteile des Zellinneren im Pellet anreichern.

Ferner ist zu sehen, dass sowohl bei niedrigerer (10 und 20  $\mu\text{mol/l}$ ) als auch bei höherer (40  $\mu\text{mol/l}$ ) anle138b-Konzentration die Reduktion des P/Ü-Quotienten ausbleibt oder dieser sogar steigt. Da aus bisherigen Publikationen zu anle138b nicht hervorgeht, über welchen Mechanismus der antiaggregative Effekt zustande kommt oder welche intrazellulären Systeme beeinflusst werden, lassen sich über die Gründe für sichtbare Effekte nur Hypothesen aufstellen. Mögliche Anhalte für Wirkmechanismen von anle138b werden in den nachstehenden Abschnitten diskutiert.

### 4.2 Proteinaggregation unter anle138b in Zellkultur

In Zellkultur ließ sich durch anle138b die Reduktion des P/Ü-Quotienten für die Mutanten G85R und G93A tendenziell zeigen. Allerdings ist das Ergebnis nicht signifikant. Bei der Mutante 127X stieg sogar der P/Ü-Quotient, wenn auch nicht signifikant (Abbildungen 12, 13, 14).

Wagner *et al.* zeigten 2013 in ihrer Arbeit eine antiaggregative Wirkung im Modell für M. Parkinson und bei Prionproteinen mit signifikantem Überlebensvorteil entsprechender behandelter Modellmäuse (Wagner *et al.* 2013). Die für fALS typischen *Lewy-body-like hyaline inclusion* (LBHI) (Kato *et al.* 2000) unterscheiden sich jedoch in ihrer Ultrastruktur von den für M. Parkinson typischen Lewy-Körperchen und vom Prion-Amyloid- $\beta$  (Chiti und Dobson 2006), was ein Grund für den weniger eindeutigen antiaggregativen Effekt in dieser Arbeit sein kann.

Unsere Zellkultur war ca. zwölf Stunden dem Transfektionsmedium samt der cDNA für die SOD1 ausgesetzt. Anschließend wurde das Medium gewechselt, anle138b zugefügt und weitere 24 Stunden inkubiert. Die Auswertung erfolgte einzeitig. Wie sich die ersten zwölf Stunden ohne Behandlung auswirken und wie sich die Dynamik der SOD1-Aggregation darstellt und ob zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht doch ein besserer antiaggregativer Effekt zu zeigen ist, lässt sich aus dieser Arbeit nicht ersehen. Es wäre denkbar, anle138b z. B. nach 4, 8, 12 Std. hinzuzugeben, um so zu einem früheren Zeitpunkt die potentielle antiaggregative Wirkung zeigen zu können. Wenn die Wirkung darin besteht, die Aggregation zu verhindern und weniger darin, die Aggregate aufzulösen, müsste anle138b zeitgleich mit der Transfektion appliziert werden. Zudem wären höherfrequente Messungen, beispielsweise stündlich, sinnvoll, um die Dynamik der Proteinaggregation im Zeitverlauf zu beschreiben. In jedem Fall könnten weitere Studien die Wirkung von anle138b auf die hSOD1-Aggregation noch tiefer beleuchten.

Nach Stathopoulos *et al.* kann Sonication generell zur Ausbildung von Proteinpräzipitaten führen (Stathopoulos *et al.* 2004). Um diesen Störfaktor möglichst gering zu halten, wurde in kurzen Intervallen bei ständiger Kühlung sonifiziert. Dieser Fehler sollte außerdem in allen Proben gleich sein und daher auch die Kontrollen betreffen, so dass der spezifische anle138b-Effekt messbar bliebe.

Wie anle138b seine Wirkung entfaltet und welche Zellsysteme es beeinflusst, bleibt nach unserer Arbeit offen, war allerdings auch nicht Gegenstand dieser.

In Zusammenschau mit den tendenziell gestiegenen Gesamtproteinmengen der Mutanten (außer G85R) und besonders der Wildtyp-SOD1, tut sich die Vermutung auf, dass möglicherweise der in viele Zellsysteme wie Metabolismus, Apoptose, Signalübertragung, Immunantwort und Qualitätskontrolle der Proteine maßgeblich involvierte proteasomale Proteinabbauapparat (Tanaka 1998) beeinträchtigt oder dass andererseits die Transkription und damit die Proteinbiosynthese gesteigert wird. Eine weitere Erklärung zur Akkumulation der Gesamt-SOD1-Menge liefert die Evidenz zur Fehlverteilung der mutierten SOD1 (Ido *et al.* 2011). Dazu siehe 4.3.

Der Anstieg der Gesamtproteinmenge fällt bei der 127X-Mutante besonders deutlich aus. Diese Akkumulation kann bei Überladung der Zellen mit SOD1 der Grund für den ansteigenden P/Ü-Quotienten sein. Die Fotografie der mit Mutante 127X transfizierten Zellen (Abbildung 8) zeigt ebenfalls deutlich mehr GFP-Signal als die der anderen Mutanten.

### 4.3 Molekularbiologische Untersuchung des Rückenmarks der *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäuse

Die molekularbiologische Untersuchung der SOD1-Fractionen im Rückenmark der *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäuse ergab zum Teil beeindruckende Ergebnisse. Bei der Diskussion der Daten ist zu bedenken, dass durch die Präparation und Aufarbeitung des vollständigen Rückenmarks die SOD1 sowohl in den Motoneuronen als auch in allen anderen im Rückenmark enthaltenen Zellen (z. B. Interneurone, vegetative Neurone, sensible Neurone, Zellen der Gefäßwände, Zellen der Hirnhäute) und im Extrazellulärraum betrachtet wird.

Durch den Einsatz von anle138b *in vivo* ist ebenfalls zu bedenken, dass Stoffwechselfvorgänge einerseits von anle138b als lipophile Substanz beeinflusst werden können. So sind intrazelluläre Membranen wie das endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat an der Proteinbiosynthese beteiligt. Die Einlagerung von anle138b in die Membranen kann unvorhersehbare Effekte auf deren Funktion in sich bergen. Andererseits ist die Substanz selbst dem Stoffwechsel ausgesetzt. Wobei vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass anle138b eine gute Bioverfügbarkeit aufweist, die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und sich im Hirngewebe gut messbar anreichert (Wagner *et al.* 2013).

Ein weiterer Grund für die abweichenden Ergebnisse von den Versuchen in HEK293-Zellkultur mag die Zellkultur an sich sein, die nicht aus Nervenzellen besteht und somit die spezifische Neurotoxizität und ihre Folgen für die Proteinkonzentrationsmessungen ausblendet. Zumal bei der ALS im Besonderen Motoneurone betroffen sind.

Die Abbildung 18 zeigt die Entwicklung des Quotienten P/Ü in Abhängigkeit vom Alter der Mäuse mit einem leichten annähernd linearen Anstieg unter Behandlung mit Placebofutter. Dagegen folgt die Zunahme des Quotienten bei den Mäusen mit Verumfutter (anle138b) einer exponentiellen Dynamik, entweder durch exponentielle Zunahme der Detergens unlöslichen Fraktion (Aggregate) oder durch die exponentielle Abnahme der löslichen Anteile, ganz im Gegensatz zu unseren Erwartungen, an eine antiaggregative Substanz.

Die Gesamt-SOD1-Menge im Rückenmark der transgenen Mäuse (Abbildung 19) entwickelt sich unter Behandlung mit Verumfutter ebenfalls bemerkenswert. So enthält das Rückenmark der jungen, 70 Tage alten Mäuse mit Verumfutter signifikant weniger SOD1 als das Gewebe gleichaltriger Mäuse mit Placebofutter. In der Alters-

spanne von 100 bis 120 Tagen zeigt die Auswertung eine Zunahme und schließlich einen höheren SOD1-Gehalt unter der Behandlung mit anle138b bei präterminalen Mäusen.

Ido *et al.* beschreiben in ihrem Review die verstärkt lipophile Struktur mutierter SOD1 im Gegensatz zur hydrophilen wt-SOD1 (Ido *et al.* 2011). Die lipophilen Anteile der mutierten SOD1 führen zur Fehlverteilung des Proteins. So wird mutierte SOD1 durch den spannungsabhängigen Anionenkanal (*voltage-dependent anion channel*, VDAC1) in Mitochondrien geschleust (Ido *et al.* 2011, Israelson *et al.* 2010). Über das endoplasmatisch retikuläre Chaperon Protein GRP78/Bip gelangt mutierte SOD1 ins endoplasmatische Retikulum und verursacht dort ER-Stress (Ido *et al.* 2011). Über die neurosekretorischen Proteine Chromogranin A (ChgA) und B (ChgB) gelangen SOD1-Mutanten in den Golgi-Apparat, über diesen aus der Zelle heraus und führen zudem zu seiner Fragmentierung (Ido *et al.* 2011). Durch seine lipophilen Eigenschaften könnte anle138b diese Translokationen verstärken und im Zuge dessen zu einem geringeren Abbau der SOD1 durch das im Zytosol lokalisierte proteasomale System beitragen. In den Versuchen mit HEK293-Zellkultur wurde das Nährmedium nicht auf Proteingehalt untersucht, dabei könnten aus den Zellen geschleuste SOD1-Anteile unberücksichtigt geblieben sein und so den weniger dramatischen Anstieg der Gesamt-SOD1-Menge erklären. Hinweise darauf, dass der SOD1-Shift nicht neuroprotektiv ist, liefert Stella Thyssens Arbeit, in der mit anle138b behandelte Mäuse gegenüber Mäusen mit Placebofutter keinen signifikanten Unterschied in der Überlebensdauer und Erhalt der motorischen Fähigkeiten aufwiesen (Abbildungen 22 und 23) (Thyssen 2012).

Laut Durand *et al.* haben Fehler in der embryonalen und postnatalen Entwicklung und Reifung des ZNS wesentlichen Einfluss auf die Neurodegeneration zu späteren Lebensphasen (Durand *et al.* 2006). Frühe Abweichungen der elektrischen Aktivität von Motoneuronen in ALS-Modellmäusen weisen auf Schäden in der Vernetzung von Zellen und bei einzelnen Zellen hin (Durand *et al.* 2006). Auch das wäre eine Erklärung für die insuffiziente Therapie junger erwachsener Mäuse mit einer antiaggregativen Substanz.

#### 4.4 Immunhistochemische Färbung der $\alpha$ -Motoneurone des Lumbalmarks der *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäuse

Die Zählung der  $\alpha$ -Motoneurone in der *Intumescentia lumbalis* der *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäuse zeigte zwischen der Verumgruppe (Mittelwert: 4 Zellen) und der Placebogruppe (Mittelwert: 3,7 Zellen) keinen signifikanten Unterschied. Bei einer Anzahl von 10 (Verum) und 13 (Placebo) Tieren pro Gruppe kann von einem repräsentativen Ergebnis ausgegangen werden. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den Überlebensdaten der Tiere aus der Arbeit von Stella Thyssen (Abbildung 22). Sie konnte zeigen, dass die Verum behandelten Tiere keinen Überlebensvorteil gegenüber den Placebo behandelten Tieren hatten (Thyssen 2012).

Bereits 1995 zeigten Dal Canto und Gurney die deutlichen morphologischen Veränderungen der Vorderhornneurone, der umliegenden weißen Substanz und der vorderen Nervenwurzeln bei transgenen SOD1-Mäusen, beginnend im Alter von ca. zwei Monaten (Dal Canto und Gurney 1995). Diesen Veränderungen folgen klinische Zeichen ab einem Alter von 80 Tagen ähnlich der ALS bei Menschen mit dem histopathologischen Korrelat des Motoneuronuntergangs (Dal Canto und Gurney 1995).

In dieser Arbeit zogen wir die Zählung der Motoneurone als Methode für die Messung der neuroprotektiven Wirkung von anle138b heran. Die Zählung erfolgte verblindet im Hinblick auf Tier- und Gruppenzugehörigkeit nach klar definierten Kriterien. Die Tiere wurden in einem Alter von 100 Tagen untersucht. Somit lässt sich aus dieser Arbeit keine Aussage über den zeitlichen Verlauf oder die morphologischen Details des Zelluntergangs treffen.

Untersuchungen von Fischer *et al.* haben gezeigt, dass lange bevor Motoneurone im Vorderhorn des Rückenmarks von Modellmäusen untergehen oder gar Proteinaggregate im histologischen Präparat nachzuweisen sind, Denervierungszeichen an den motorischen Endplatten in der Muskulatur auftreten (Fischer *et al.* 2004). Es liegen Hinweise vor, dass allein die Expression von mutierten SOD1-Spezies in Nervenzellen ausreicht, um Neurotoxizität und ALS-Symptome bei den *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäuse zu induzieren (Deng *et al.* 1993, Jaarsma *et al.* 2008). Beides stützt die Hypothese, dass nicht die Proteinaggregate sondern andere SOD1-Fraktionen und/oder sonstige Mechanismen zur nachweislichen Apoptose führen. In die gleiche Richtung deuten auch die Ergebnisse unserer Arbeit unter 3.3, wo der exponentielle Anstieg des P/Ü-Quotienten bei Verum behandelten Tieren zu sehen

ist, ohne dass diese Tiere früher versterben oder Abweichungen in der Zahl der Motoneurone aufweisen. Anle138b führt durch einen in dieser Arbeit nicht untersuchten Mechanismus zur Zunahme der Proteinaggregate ohne nachweisliche Neuroprotektion. Diese Befunde in Zusammenschau mit den bereits in diesem Absatz aufgeführten Hinweisen legen die Hypothese nahe, dass die Proteinaggregate eine Art Depot der Zelle für toxische Proteinspezies darstellen ohne selbst als solche der einzelnen Zelle zu schaden. Dieses Depot kann am Ende einer Stoffwechsellkaskade gerichtet, im Rahmen eines Entgiftungsmechanismus, oder ungerichtet, eher als Zufallsprodukt vorhergehender insuffizienter Abbaumechanismen, entstehen.

## 5. Zusammenfassung

Die Amyotrophe Lateralsklerose wurde erstmalig 1873 von Jean Martin Charcot beschrieben und ist eine in den meisten Fällen tödlich verlaufende, progrediente neurodegenerative Erkrankung des vorzugsweise mittleren bis höheren Lebensalters. Sie betrifft in erster Linie die motorischen Nervenbahnen, die in der Pyramidenbahn durch das erste, kortikal gelegene, und zweite, im Hirnstamm oder spinal gelegene, Motoneuron repräsentiert sind. Es gibt Verläufe mit primärer Affektion der Extremitätenmuskulatur oder in ca. 25% der Hirnnervenkerne mit bulbärem Verlauf (Körner *et al.* 2011). Mit zunehmendem Krankheitsverlauf kommt es bei den Betroffenen zu Lähmungen der Willkürmotorik mit Beteiligung der Schlund-, Atem- und Atemhilfsmuskulatur, sodass häufig Komplikationen wie Aspirationspneumonien oder Lungenembolien zum Tod führen oder die Patienten ohne eine unterstützende Beatmung an einer respiratorischen Insuffizienz versterben. Eine Beteiligung weiterer neuronaler Strukturen mit entsprechenden neurologischen Ausfällen wird ebenfalls beschrieben. In dem Rahmen weiß man von Degeneration des frontotemporalen Kortex, der Basalganglien und der lange als nicht betroffen geglaubten somatosensiblen Bahnen und der Okulomotorik (Iglesias *et al.* 2015, Iwanaga *et al.* 1997, Leveille *et al.* 1982). Eine Beteiligung frontaler kortikaler Areale führt zu dementieller Entwicklung und wird als frontotemporale Demenz (FTD) bezeichnet. Die FTD kann isoliert oder als Mischbild mit einer ALS auftreten.

Etwa 90% der ALS-Fälle treten sporadisch auf. Die restlichen 5-10% folgen unterschiedlichen Vererbungsmustern (z. B. autosomal dominant, autosomal rezessiv, x-chromosomal) mit Mutationen in 12 bis heute beschriebenen Genen. Wobei Genmutationen auch bei Patienten mit sporadischem Auftreten der Erkrankung nachweisbar sind. Was dafür spricht, dass entweder Neumutationen auftreten oder die klinische Manifestation der ALS einer unterschiedlichen Penetranz unterliegt bis zu asymptomatischen Mutationsträgern. Und diese Beobachtung wiederum suggeriert das Zusammenspiel von Genetik, Epigenetik und Umwelteinflüssen. Die drei häufigsten betroffenen Gene sind die SOD1 (Superoxiddismutase 1), ca. 10% der familiären ALS betreffend, das TDP-43 (*transactive response DNA-binding protein 43 kDa*) und FUS (*fused in sarcoma*) (Andersen und Al-Chalabi 2011).

Zum heutigen Zeitpunkt beschränkt sich die kausale Therapie auf den Glutamatantagonisten Riluzol, basierend auf der Hypothese der Exzitotoxizität einer erhöhten Glu-

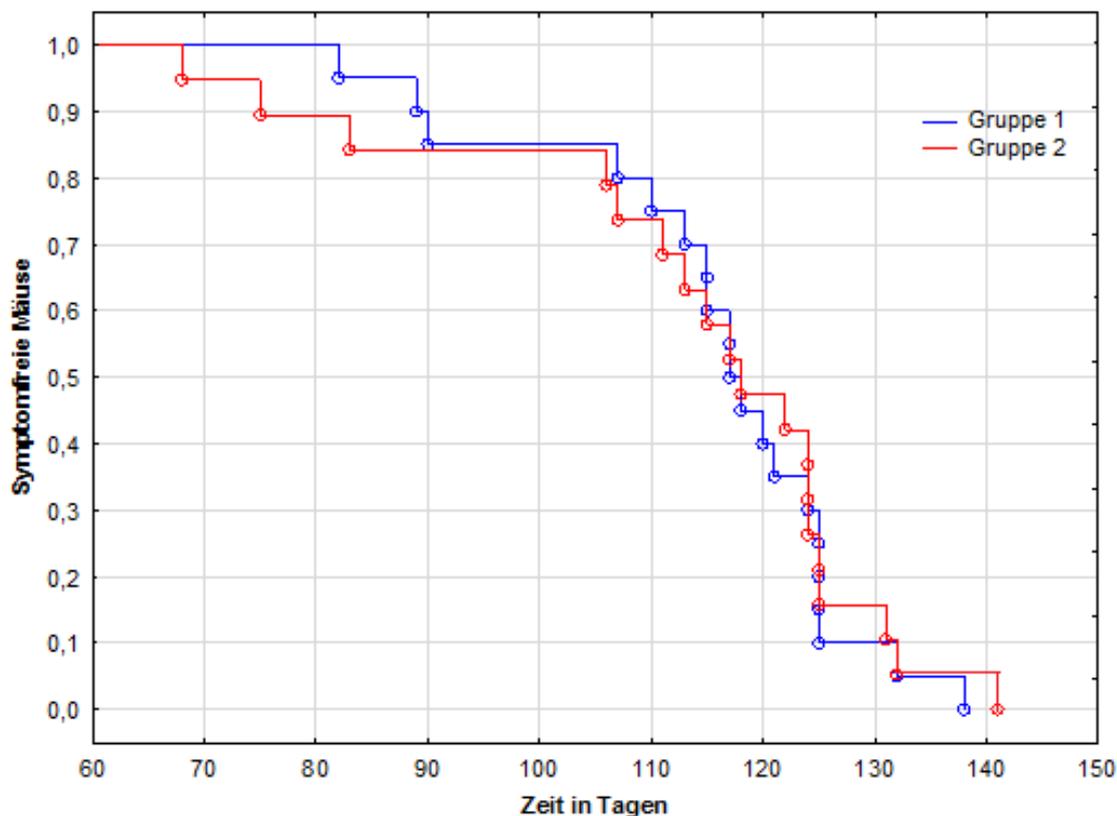
tamatkonzentration im ZNS-Parenchym (Bensimon *et al.* 1994). Riluzol verlängerte das Überleben der Betroffenen in der Zulassungsstudie von 1994 um ca. drei Monate (Bensimon *et al.* 1994). Daneben wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Pathomechanismen wie unter anderem die mitochondriale Dysfunktion, Toxizität durch reaktive Sauerstoffspezies oder eine entzündliche Genese diskutiert, führten jedoch bei nachweislichen Pathologien nicht zur Identifizierung eines erfolgsversprechenden therapeutischen Targets. Neueste Untersuchungen liefern den dringenden Hinweis auf eine Prion-ähnliche Ausbreitung des TDP-43 über synaptischen Kontakt zwischen den Zellen (Braak *et al.* 2013).

Ein typisches Merkmal der ALS, ähnlich neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimerdemenz ( $\beta$ -Amyloid) und dem Morbus Parkinson ( $\alpha$ -Synuclein), sind intraneuronale Proteineinschlüsse (Uversky 2010), die sich in diesem Fall neben anderen Proteinen, wie dem erwähnten TDP-43 oder Ubiquitin, SOD1-positiv darstellen lassen (Kato *et al.* 2000). Aus dieser Beobachtung resultierte der Begriff der Proteinopathien mit der Hypothese einer Toxizität der Proteineinschlüsse, respektive Proteinaggregate.

Im Jahr 2013 präsentierte die Arbeitsgruppe um A. Giese und C. Griesinger ein neues antiaggregatives Compound mit der Bezeichnung anle138b. *In vitro* und *in vivo* Studien an Mausmodellen für den M. Parkinson und für die Prionenerkrankung Creutzfeld-Jakob-Disease (CJD) zeigten eine Reduktion der Proteinaggregate und einen Überlebensvorteil für die mit anle138b behandelten Mäuse (Wagner *et al.* 2013).

In dieser Arbeit und in den parallel von Stella Thyssen durchgeführten Studien wurde *in vitro* und *in vivo* an SOD1-ALS-Modellmäusen die antiaggregative Wirkung mit molekularbiologischer Untersuchung des Rückenmarks (Absatz 3.4.1), die neuroprotektive Wirkung mit histologischer Aufarbeitung und Zählung der  $\alpha$ -Motoneurone (2. Motorisches Neuron) im Vorderhirn des Rückenmarks (Absatz 3.5.1) und die Auswirkung auf die motorische Aktivität sowie ein Überlebensvorteil der Tiere (Abbildung 22 und 23) untersucht (Thyssen 2012). Dazu wurde *B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäusen, Modelltiere für die ALS mit der G93A-Mutation der SOD1, mit anle138b angereichertes Futter verabreicht. Zudem wurden in HEK293-Zellkultur, die zu SOD1-positiven Proteinaggregaten führenden und ALS verursachenden, SOD1-Mutationen G85R, G93A und 127X auf eine potentielle Reduktion der Proteinaggregate untersucht (Absatz 3.3.1).

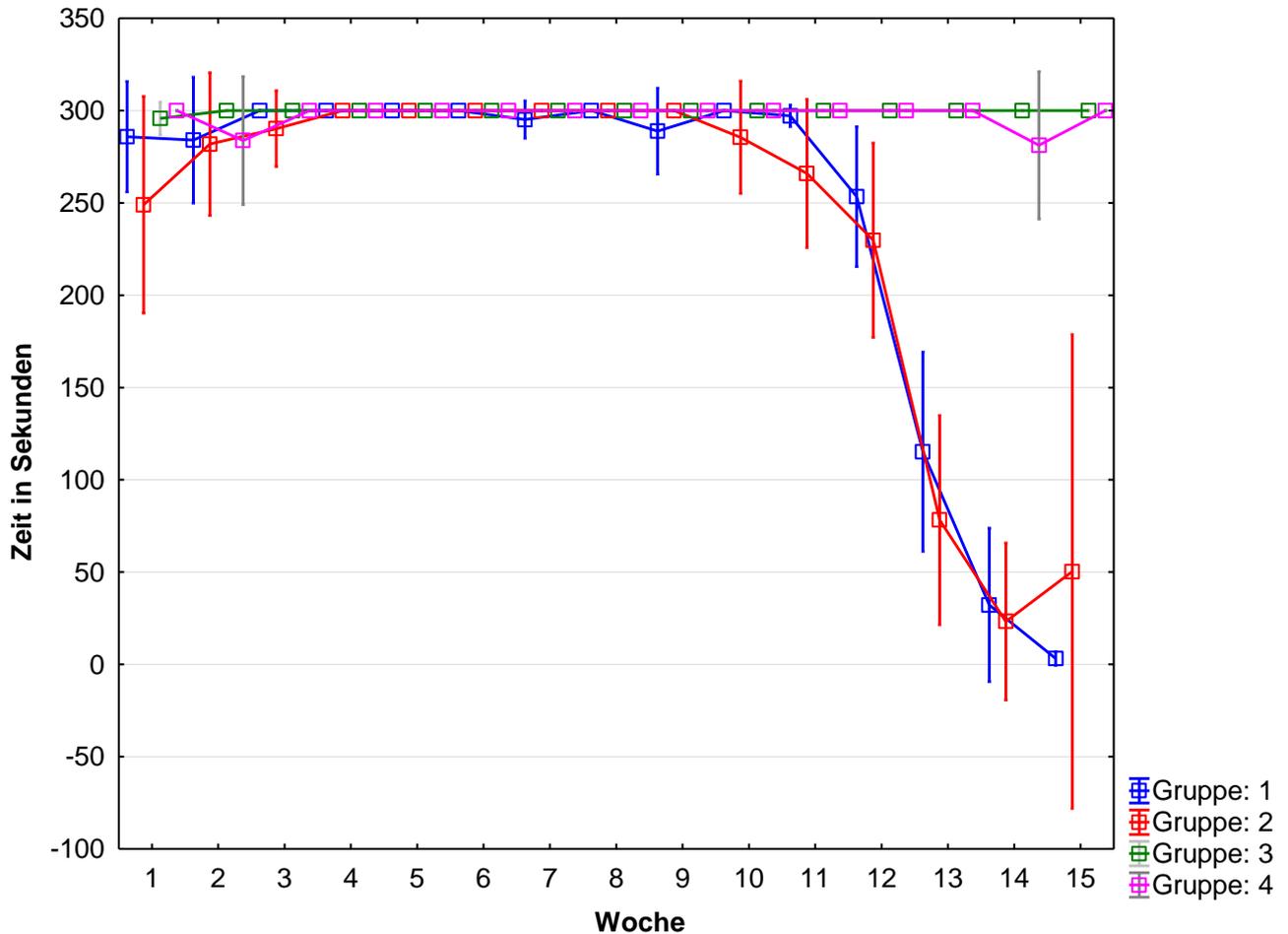
In der Zellkultur konnte anle138b bei den SOD1-Mutationen G85R und G93A die Proteinaggregation, allerdings nicht signifikant in dieser Arbeit, senken (Abbildung 12 und 13). Bei der 127X-Mutation konnte kein Nachweis einer reduzierten Proteinaggregatmenge erbracht werden (Abbildung 14). Im Mausmodell kumulierten die Proteinaggregate exponentiell im Laufe des Lebens der Tiere (Abbildung 18). Zudem konnte beobachtet werden, dass die Gesamt-SOD1-Menge sowohl in der Zellkultur als auch im Mausmodell unter Behandlung mit anle138b zunahm (Abbildung 15 und 19). Die Auszählung der  $\alpha$ -Motoneurone zeigte weitestgehend unveränderte Zellzahlen unter Behandlung mit anle138b im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren und somit keinen neuroprotektiven Effekt (Abbildung 21 und Tabelle 5). Die Überlebensdaten der Mausgruppen in den Studien von Stella Thyssen konnten bei den mit anle138b behandelten Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls keinen Überlebensvorteil und ebenso wenig eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten nachweisen (Thyssen 2012).



(Thyssen 2012)

#### Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve für die Überlebenszeit der transgenen Mäuse

Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Überlebenszeit der behandelten und nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 1 und 2).



(Thyssen 2012)

#### Abbildung 23: Koordinative und motorische Fähigkeiten (Rotarod-Versuch)

Die behandelten und die nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 1, behandelte transgene Mäuse, und Gruppe 2, nicht behandelte transgene Mäuse) erfüllten auf dem Rotarod laufend ab der zehnten bzw. elften Woche die Zeitvorgabe von 300 Sekunden in zunehmender Anzahl nicht mehr. Die Fertigkeiten der Wildtypiere blieben im Untersuchungszeitraum unbeeinträchtigt (Gruppe 3 und 4). Der Rotarod-Versuch wurde zur Überprüfung der Laufleistung sowie von Koordination und Gleichgewicht vorrangig für Mäuse und Ratten entwickelt (Dunham und Miya 1957).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weder in der SOD1-Zellkultur noch im SOD1 G93A-Mausmodell (*B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur*-Mäuse) die antiaggregative oder neuroprotektive Wirkung von anle138b gezeigt werden. Dies kann diverse Gründe haben und wurde im Absatz 4.1 bis 4.4 diskutiert. Bemerkenswert ist aber, dass die Überlebensdauer und die motorischen Fähigkeiten trotz der exponentiellen Zunahme der Proteinaggregate unter Behandlung mit anle138b keinen Unterschied zu den unbehandelten Tieren aufweist. Diese Beobachtung suggeriert, dass die Proteinaggregate

für sich keinen zytotoxischen Effekt haben (Absatz 4.4). Hinweise auf die Neurotoxizität von vorangehenden Proteinoligomeren lieferten in der Vergangenheit bereits Untersuchungen zu zytotoxischen SOD1-Oligomer-Epitopen (Redler *et al.* 2014). Die Konsequenz aus dem Wissen um die SOD1-Oligomer-Toxizität lässt im Hinblick auf die Ergebnisse unserer Studien darauf schließen, dass anle138b auch nicht die Oligomer-Epitope zu inhibieren vermag. Nach den 2013 von Braak *et al.* publizierten Daten zur Prion-ähnlichen Verbreitung von TDP-43 (Braak *et al.* 2013) und dem Nachweis von TDP-43-Mutationen bei familiärer und sporadischer ALS könnten anle138b-Studien an TDP-43-ALS-Modellmäusen (Xu *et al.* 2011) in Zukunft interessant sein, zumal die neuroprotektive Wirkung bei CJD-Modellmäusen belegt scheint (Wagner *et al.* 2013).

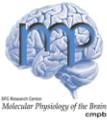
## 6. Literaturverzeichnis

1. Andersen PM, Al-Chalabi A (2011): Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol* 7, 603-15
2. Andersen PM, Nilsson P, Keranen ML, Forsgren L, Hagglund J, Karlsborg M, Ronnevi LO, Gredal O, Marklund SL (1997): Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia. *Brain* 120 (Pt 10), 1723-37
3. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y (2006): TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 602-11
4. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V (1994): A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* 330, 585-91
5. Braak H, Brettschneider J, Ludolph AC, Lee VM, Trojanowski JQ, Del Tredici K (2013): Amyotrophic lateral sclerosis--a model of corticofugal axonal spread. *Nat Rev Neurol* 9, 708-14
6. Chattopadhyay M, Valentine JS (2009): Aggregation of copper-zinc superoxide dismutase in familial and sporadic ALS. *Antioxid Redox Signal* 11, 1603-14
7. Chiti F, Dobson CM (2006): Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 75, 333-66
8. Dal Canto MC, Gurney ME (1995): Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res* 676, 25-40
9. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J (2011): Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245-56
10. Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP (1993): Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261, 1047-51
11. Durand J, Amendola J, Bories C, Lamotte d'Incamps B (2006): Early abnormalities in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol Paris* 99, 211-20
12. 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, 232-40
13. Freischmidt A, Wieland T, Richter B, Ruf W, Schaeffer V, Muller K, Marroquin N, Nordin F, Hubers A, Weydt P (2015): Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat Neurosci* 18, 631-6
14. Graham FL, van der Eb AJ (1973): Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54, 536-9
15. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74
16. 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, 1772-5
17. Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, Andrus PK, Hall ED (1996): Pathogenic mechanisms in familial amyotrophic lateral sclerosis due to mutation of Cu, Zn superoxide dismutase. *Pathol Biol (Paris)* 44, 51-6
18. Ido A, Fukuyama H, Urushitani M (2011): Protein Misdirection Inside and Outside Motor Neurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): A Possible Clue for Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci* 12, 6980-7003

19. Iglesias C, Sangari S, El Mendili MM, Benali H, Marchand-Pauvert V, Pradat PF (2015): Electrophysiological and spinal imaging evidences for sensory dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open* 5, e007659
20. Israelson A, Arbel N, Da Cruz S, Ilieva H, Yamanaka K, Shoshan-Barmatz V, Cleveland DW (2010): Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS. *Neuron* 67, 575-87
21. Iwanaga K, Hayashi S, Oyake M, Horikawa Y, Hayashi T, Wakabayashi M, Kondo H, Tsuji S, Takahashi H (1997): Neuropathology of sporadic amyotrophic lateral sclerosis of long duration. *J Neurol Sci* 146, 139-43
22. Jaarsma D, Teuling E, Haasdijk ED, De Zeeuw CI, Hoogenraad CC (2008): Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *J Neurosci* 28, 2075-88
23. Jonsson PA, Ernhill K, Andersen PM, Bergemalm D, Brannstrom T, Gredal O, Nilsson P, Marklund SL (2004): Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 127, 73-88
24. Karch CM, Prudencio M, Winkler DD, Hart PJ, Borchelt DR (2009): Role of mutant SOD1 disulfide oxidation and aggregation in the pathogenesis of familial ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7774-9
25. Kato S, Takikawa M, Nakashima K, Hirano A, Cleveland DW, Kusaka H, Shibata N, Kato M, Nakano I, Ohama E (2000): New consensus research on neuropathological aspects of familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase 1 (SOD1) gene mutations: inclusions containing SOD1 in neurons and astrocytes. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1, 163-84
26. Kerman A, Liu HN, Croul S, Bilbao J, Rogaeva E, Zinman L, Robertson J, Chakrabartty A (2010): Amyotrophic lateral sclerosis is a non-amyloid disease in which extensive misfolding of SOD1 is unique to the familial form. *Acta Neuropathol* 119, 335-44
27. Kollewe K, Dengler R, Andersen PM, Borasio GD, Hardiman O, Leigh PN, Pradat PF, Silani V, Tomik B. Klinische Leitlinien zur Behandlung der Amyotrophen Lateralsklerose - Evidenzbasierte Übersicht mit Therapieempfehlungen der Arbeitsgruppe der EALSC und der EFNS. *Nervenheilkunde* 2008; 27: 302-316.
28. Körner S, Dengler R, Petri S (2011): Diagnostik der amyotrophen Lateralsklerose. *J Neurol, Neurochir und Psychiatr* 2/2011, 124-128
29. Kuzma-Kozakiewicz M, Kwiecinski H (2009): The genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neurochir Pol* 43, 538-49
30. Leveille A, Kiernan J, Goodwin JA, Antel J (1982): Eye movements in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 39, 684-6
31. Liscic RM, Breljak D (2011): Molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35, 370-2
32. Ludolph AC, Brettschneider J (2015): TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis - is it a prion disease? *Eur J Neurol* 22, 753-61
33. Maier CM, Chan PH (2002): Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 8, 323-34
34. Mumenthaler M, Mattle H: *Neurologie*. Thieme; Stuttgart 2002.
35. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM (2006): Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130-3
36. Redler RL, Fee L, Fay JM, Caplow M, Dokholyan NV (2014): Non-native soluble oligomers of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) contain a conformational epitope linked to cytotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Biochemistry* 53, 2423-32
37. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX (1993): Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59-62
38. Sahawneh MA, Ricart KC, Roberts BR, Bomben VC, Basso M, Ye Y, Sahawneh J, Franco MC, Beckman JS, Estevez AG (2010): Cu,Zn-superoxide dismutase increases toxicity of mutant and zinc-deficient superoxide dismutase by enhancing protein stability. *J Biol Chem* 285, 33885-97

39. Stathopoulos PB, Scholz GA, Hwang YM, Rumfeldt JA, Lepock JR, Meiering EM (2004): Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Sci* 13, 3017-27
40. Tanaka K (1998): Molecular biology of the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 537-41
41. Thyssen S.: Einfluss des Proteinaggregationshemmstoffs anle138b auf Beginn und Verlauf der Amyotrophen Lateralsklerose im transgenen hSOD1- Musmodell. Göttingen: Med. Diss. Goettingen 2012.
42. Uversky VN (2010): Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins. *Febs J* 277, 2940-53
43. Valentine JS, Hart PJ (2003): Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3617-22
44. Valentine JS, Doucette PA, Zittin Potter S (2005): Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Biochem* 74, 563-93
45. Wagner J, Ryazanov S, Leonov A, Levin J, Shi S, Schmidt F, Prix C, Pan-Montojo F, Bertsch U, Mitteregger-Kretzschmar G (2013): Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 125, 795-813
46. Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, Price DL, Wong PC, Rothstein JD (2001): Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis* 8, 933-41
47. Wijesekera LC, Leigh PN (2009): Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 4, 3
48. Witan H, Kern A, Koziollik-Drechsler I, Wade R, Behl C, Clement AM (2008): Heterodimer formation of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis-causing mutant Cu/Zn-superoxide dismutase induces toxicity independent of protein aggregation. *Hum Mol Genet* 17, 1373-85
49. Witan H, Gorlovoy P, Kaya AM, Koziollik-Drechsler I, Neumann H, Behl C, Clement AM (2009): Wild-type Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) does not facilitate, but impedes the formation of protein aggregates of amyotrophic lateral sclerosis causing mutant SOD1. *Neurobiol Dis* 36, 331-42
50. Worms PM (2001): The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci* 191, 3-9
51. Xu YF, Zhang YJ, Lin WL, Cao X, Stetler C, Dickson DW, Lewis J, Petrucelli L (2011): Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. *Mol Neurodegener* 6, 73

# Publikation zum Thema der Dissertation



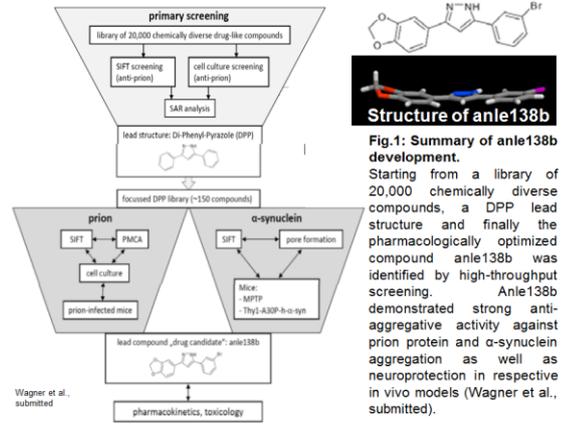
UNIVERSITÄTSMEDIZIN GÖTTINGEN : UMG

## Inhibition of pathological protein aggregation in ALS

Bettina Göricke, Alexander Kleinknecht, Stella Thyssen, Tobias Frank, Sergey Ryazanov, Christian Griesinger, Mathias Bähr, Jochen H. Weishaupt

### Background

Pathological protein aggregation is a distinguishing hallmark of many neurodegenerative diseases including amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Intracellular protein deposits are found in sporadic as well as in hereditary cases of ALS. However, the pathophysiological relevance and the causative contribution of aggregate formation to toxicity mechanisms remain largely unclear with respect to ALS. Recently, it was shown that 3,5-diphenyl-pyrazole (DPP) derivatives have high antiaggregative and neuroprotective potency in prion and  $\alpha$ -synuclein models of neurodegeneration. We investigate if one of the drug candidates amongst the DPP derivatives, anle138b, is able to prevent pathological SOD1<sup>G93A</sup> aggregation and toxicity in vitro and in vivo. Our study aims to preclinically evaluate the therapeutic potential of DPP derivatives in ALS and to further substantiate the "aggregopathy" hypothesis for mutant SOD1 toxicity.



### Conclusion

- Anle138b inhibits aggregation of mutant SOD1 in vitro and improves survival and motor performance in SOD1<sup>G93A</sup> transgenic mice.
- Protective effects of anle138b are likely due to inhibition of pathological mutant SOD1 aggregation and corroborate the contribution of protein aggregate formation to toxic pathways in ALS.
- Further pre-clinical development of anle138b and a phase I study is warranted.

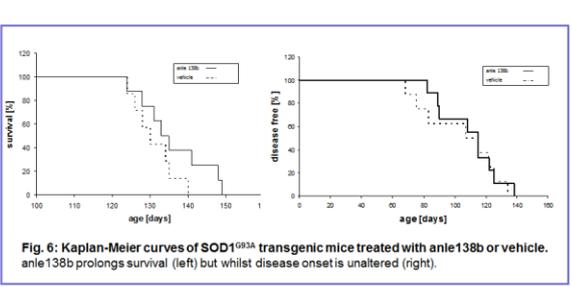
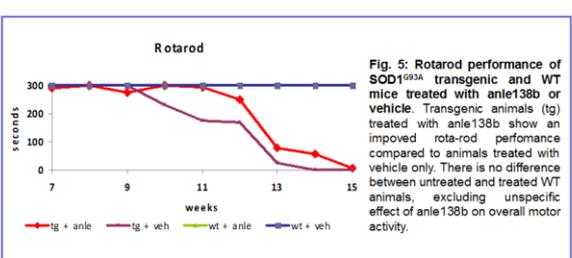
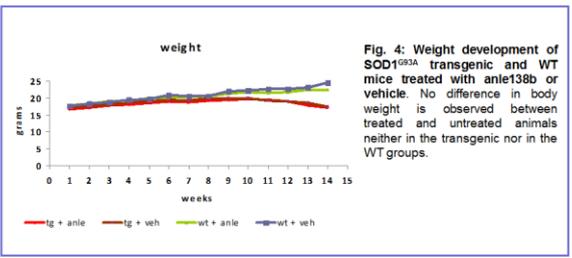
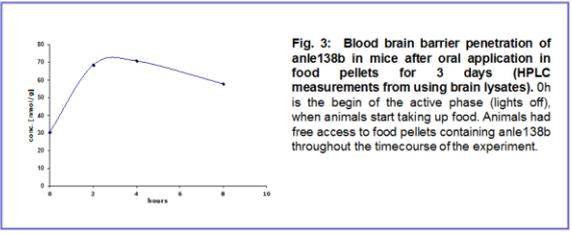
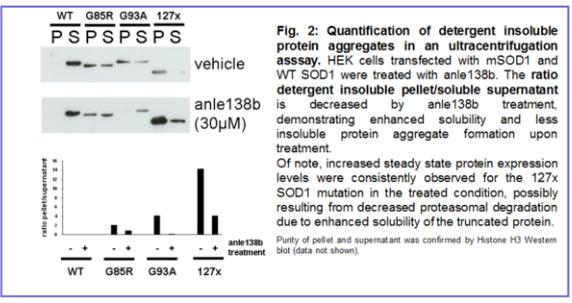
### Methods

**Animal experiments:** For all experiments B6SJL-Tg(SOD1-G93A)Gur/J female mice were used. Mice were kept under a 12h dark/light cycle with free access to water and food. Food pellets for the treatment group contained anle138b 1mg/g. Taken a daily food intake of 5g, mice got 5mg anle138b per day. Rotarod performance and weight were measured weekly. In the symptomatic phase, weight was measured daily. Survival time was defined by fulfilling the abruption criteria, those were loss of weight of more than 10% of body weight during on week or inability to erect from lateral position for more than 15 seconds. Each group consists of ten mice.

**Pharmacokinetics:** Female B6SJL-mice were kept as described above. Food contained again 1mg/g anle138b. Mice were fed over three days to get a steady state. Three mice were each killed at timepoint 0h (beginning of active phase when light is turned off), 2h, 4h and 8h. Animals were killed by breaking the neck, total brains were removed and frozen at -80°C immediately. HPLC was performed to a common protocol.

**Cell culture procedures and proteomics:** HEK cells were transfected with mSOD1 or WT SOD1 using calcium phosphate transfection. The day after transfection, 30µM anle138b and DMSO or DMSO (control) only were added. Lysates were done three days after transfection in presence of detergent. Lysates were separated in a pellet and supernatant fraction by ultracentrifugation for one hour. Pellet fraction was sonicated. Western blot was performed for human SOD1 and histone H3 (data not shown) following a common protocol. Western Blots were analysed densitometrically. Ratios (pellet/supernatant) give the relation of aggregated (pellet) to soluble (supernatant) mutant and WT SOD1.

### Results



## Danksagung

An dieser Stelle ist es mir wichtig, denjenigen Dank auszusprechen, die diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben. Es ist zum einen Prof. Dr. med. Mathias Bähr, in dessen Abteilung als Direktor diese Arbeit ermöglicht, vollzogen und schließlich zu ihrem Ende geführt werden konnte. Es ist aber gleichfalls Prof. Dr. Jochen Weishaupt in seiner Zeit an der Universitätsmedizin Göttingen, aktuell tätig an der Universität Ulm, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit konzipiert, entstanden und labortechnisch durchgeführt wurde. Mein besonderer Dank für ihre unermüdliche Hilfe bei der Organisation und Einarbeitung im Labor, bei der Unterstützung und der Auswertung sowie beim Korrigieren der zahllosen Tippfehler geht an Dr. med. Bettina Göricke. Des Weiteren richtet sich ein großer Dank an die Mitglieder der Arbeitsgruppe um Sergey Ryazanov und Christian Griesinger am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, die durch die Entwicklung der in dieser Studie untersuchten Substanz anle138b die Voraussetzung für diese tierexperimentelle Studie geschaffen haben. Für ihre Hilfe bei den täglichen Herausforderungen im Labor danke ich ebenfalls herzlich Christine Poser, Dr. Anja Büchner, Dr. rer. nat. Katrin Eckermann, Barbara Müller, Sabine Ceramella sowie Prof. Dr. rer. nat. Uwe Michel.

Ferner richtet sich ein Dank an Christian Röver und die Mitarbeiter der Abteilung Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Versuchsdaten. Und für den regen Austausch und die konstruktive Zusammenarbeit danke ich Stella Thyssen.

Des Weiteren geht ein Dank an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen, die die Rahmenbedingungen für die Tierversuche geschaffen haben.

## Lebenslauf

Ich wurde als erstes von zwei Kindern am 26.04.1983 in Bischkek, der Hauptstadt von Kirgisistan von Nina Kleinknecht, Ärztin für Innere Medizin, und Alexander Kleinknecht, Arbeiter für Energieelektrik und Elektroinstallationen, im Jahr 2005 verstorben, geboren. Mein jüngerer Bruder, Student des Supply Chain Managements an der Hochschule Fulda wurde am 05.05.1987 geboren.

Von September 1990 bis Mai 1991 besuchte ich eine Grundschule in Bischkek. Im September 1991 folgte der Umzug der Familie als Aussiedler nach Lemgo, Nordrhein-Westfalen. Dort besuchte ich von 1991 bis 1995 die Grundschule Süd und von 1995 bis 2001 die Bürgermeister-Gräfer-Realschule. Es folgte von September 2001 bis Mai 2004 eine Berufsausbildung zum Kommunikationselektroniker bei Phoenix Contact in Blomberg.

Danach besuchte ich im zweiten Bildungsweg das Westfalen-Kolleg in Bielefeld und erlangte am 18.07.2007 die Allgemeine Hochschulreife (Note 1,1). Dabei erhielt ich von der Gesellschaft Deutscher Chemiker den GDCh-Preis für den Jahrgangsbesten Abiturienten im Fach Chemie.

Anschließend begann ich das Studium der Humanmedizin an der Universitätsmedizin in Göttingen und schloss es nach dem Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 23.09.2009 (Note 2,0) und Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 28.04.2014 (Note 2,33) erfolgreich ab. Dabei absolvierte ich Pflegepraktika in der Abteilung Orthopädie und Unfallchirurgie am Klinikum Lippe in Detmold sowie in den Kliniken für Neurologie und Psychiatrie der Universitätsmedizin Göttingen. In den Famulaturen arbeitete ich in der Pneumologischen Klinik Lengern des Evangelischen Krankenhauses Göttingen-Weende e. V., in der Klinik für Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen und in der Wirbelsäulenchirurgie der Orthopädischen Klinik Hessisch Lichtenau. Während des Studiums war ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Zentrum Anatomie und in der Klinischen Chemie des Universitätsklinikums Göttingen tätig. Von 2008 bis 2014 war ich Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes. Im März 2011 begann ich meine Promotion.

Im Mai 2014 heiratete ich Alexandra Kleinknecht, geb. Juckert, PhD-Studentin des Instituts für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen.

Aktuell befinde ich mich im dritten Jahr der Weiterbildung zum Facharzt für Neurologie an der Klinik für Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen und betreue seit

Sommer 2015 die Spezialambulanzen für Botulinumtoxintherapie und Neurovaskuläre Erkrankungen. Zudem bin ich seit dem Sommersemester 2015 als Dozent für die Anatomie des Nervensystems an der Schule für Physiotherapie der UMG tätig.

Im Rahmen der wissenschaftlichen Arbeit habe ich als Koautor an der Publikation *Reducing tau aggregates with anle138b delays disease progression in a mouse model of tauopathies* in Acta Neuropathologica 10/2015 mitgewirkt. Und habe ebenfalls als Koautor einen Posterpreis für das Poster *Inhibition of pathological protein aggregation in ALS: new therapeutic aspects* bei der DGN-Tagung 2011 von der Deutschen Gesellschaft für Neurologie erhalten.