Aus der Abteilung Neurologie
(Prof. Dr. M. Bähr)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Einfluss des Proteinaggregationshemmstoffs anle138b auf Beginn und Verlauf der Amyotrophen Lateralsklerose im transgenen *hSOD1*-Mausmodell

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

vorgelegt von
Stella Thyssen
aus
Hofgeismar

Göttingen 2013

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. J. Weishaupt
2. Berichterstatter:	PD Dr. O. Wirths
Tag der mündlichen Prüfung:	24. Juni 2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung ... 1

1.1 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ... 1

1.1.1 Definition ... 1
1.1.2 Name ... 1
1.1.3 Klassifikation ... 1
1.1.4 Geschichte ... 2
1.1.5 Epidemiologie ... 3
1.1.6 Krankheitsbild ... 4
1.1.7 Krankheitsverlauf ... 6
1.1.8 Diagnostik ... 6
1.1.9 Ätiologie ... 8
1.1.10 Pathogenese ... 9
1.1.10.1 Proteinaggregationshypothese ... 9
1.1.10.2 Proteine ... 12
1.1.10.2.1 SOD1 ... 12
1.1.10.2.2 TDP-43 ... 15
1.1.10.2.3 FUS ... 16
1.1.10.2.4 UBQLN2 ... 16
1.1.10.2.5 C9ORF72 ... 16
1.1.10.2.6 Profilin 1 ... 17
1.1.10.3 Weitere Hypothesen ... 17
1.1.11 Therapie ... 18
1.1.11.1 Neuroprotektive Therapie ... 19
1.1.11.2 Symptomatische Therapie ... 19

1.2 Experimentelle Therapieforschung ... 20

1.2.1 *hSOD1*-Mausmodell ... 21
1.2.2 Proteinaggregationshemmung ... 22
1.2.2.1 Anle138b ... 23

1.3 Ziel der Studie ... 24

2 Material und Methoden ... 26

2.1 Studiendesign ... 26

2.2 Versuchstiere ... 26

2.2.1 Wildtyp-Mäuse ... 27
2.2.2 *hSOD1*-transgene Mäuse ... 27
2.2.3 Versuchsgruppen ... 28

2.3 Rahmenbedingungen ... 28

2.3.1 Versuchszeitraum ... 28
2.3.2 Versuchsraum ... 28

2.3.3 Tierhaltung ... 30

2.4 Versuche ... 31
2.4.1 Laufleistung (Laufrad-Versuch) ... 32
2.4.1.1 Testgerät Laufrad ... 33
2.4.2 Gewicht ... 33
2.4.3 Griffkraft (Grip-Strength-Versuch) ... 34
2.4.3.1 Testgerät Grip-Strength-Meter ... 35
2.4.4 Koordintorische und motorischen Fähigkeiten (Rotarod-Versuch) ... 35
2.4.4.1 Testgerät Rotarod ... 36

2.5 Krankheitsbeginn und Überlebenszeit ... 37

2.6 Endpunktkriterien (Versuchsende) ... 38
2.6.1 Gewichtsverlust ... 38
2.6.2 Abfall der Laufleistung ... 38
2.6.3 Verlust motorischer Fähigkeiten ... 38

2.7 Statistische Methoden ... 39

2.8 Weiterführende Forschung ... 40

3 Ergebnisse ... 41

3.1 Daten ... 41

3.2 Auswertung ... 41
3.2.1 Laufleistung (Laufrad-Versuch) ... 43
3.2.1.1 Anzahl der Läufe ... 44
3.2.1.2 Gesamtdistanz ... 46
3.2.1.3 Maximalgeschwindigkeit ... 49
3.2.1.4 Gesamtlaufzeit ... 50
3.2.2 Gewicht ... 53
3.2.3 Griffkraft (Grip-Strength-Versuch) ... 56
3.2.4 Koordinatorische und motorische Fähigkeiten (Rotarod-Versuch) ... 59
3.2.5 Krankheitsbeginn ... 61
3.2.6 Überlebenszeit ... 62

4 Diskussion ... 63

4.1 Behandlungsergebnis ... 63
4.1.1 Motorische Fähigkeiten ... 63
4.1.1.1 Laufrad-, Grip-Strength- und Rotarod-Versuch ... 63
4.1.2 Gewicht ... 66
4.1.3 Krankheitsbeginn und Überlebenszeit ... 66

4.2 Studiendesign ... 69
4.2.1 Versuchstiere (*hSOD1*-Mausmodell) ... 69
4.2.2 Statistische Methoden ... 72

4.3 Anle138b und die Proteinaggregationshypothese ... 73

4.4 Konsequenzen für die klinische Therapieforschung 75

5 Zusammenfassung 81

5.1 Überblick 81

5.2 Studiendesign 81

5.3 Ergebnisse 82

5.4 Schlussfolgerung 82

6 Literaturverzeichnis 83

7 Abbildungsverzeichnis 94

8 Tabellenverzeichnis 96

9 Anhang: Nicht verwendetes Material 97

9.1 Durchschnittsdistanz 97

9.2 Durchschnittsgeschwindigkeit 98

9.3 Durchschnittliche Laufzeit 99

10 Publikation zum Thema der Dissertation 100

Danksagung 101

Lebenslauf 102

Abkürzungsverzeichnis

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Anle138b	3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1H-Pyrazol
ANOVA	Varianzanalyse
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CK	Creatinkinase
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
Cu	Kupfer
Cu/Zn-SOD1	Kupfer-/Zink-Superoxiddismutase 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMG	Elektromyographie
ENG	Elektroneurographie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
fALS	Familiäre Amyotrophe Lateralsklerose
fT3	Freies Trijodthyronin
fT4	Freies Tetrajodthyronin (Thyroxin)
FTD	Frontotemporale Demenz
FTLD	Frontotemporale Lobärdegeneration
FTLD-U	Frontotemporale Lobärdegeneration mit Ubiquitin-Inklusionen
FUS	Fused in sarcoma (=TLS)
g	Gramm
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunden
H	Wasserstoff
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HSC70	Konstitutiv exprimierte Isoform des Hitzeschockproteins 70
HSOD1	Humane Superoxiddismutase 1
HSP	Hitzeschockprotein
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme

jALS	Juvenile Amyotrophe Lateralsklerose
kDa	Kilo-Dalton
km	Kilometer
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LMN	Lower motor neuron
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minuten
Mn	Mangan
MND	Motor neuron disease
MPI	Max-Planck-Institut
MRT	Magnetresonanztomographie
mSOD1	Mutierte Superoxiddismutase 1
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O_2	Sauerstoff
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Perkutane endoskopische Gastrostomie
PFN1	Profilin 1
PMA	Progressive muscular atrophy
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunden
sALS	Sporadische Amyotrophe Lateralsklerose
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
SOD1	Superoxiddismutase 1
TAR-DNA	Transactive response-DNA
TDP-43	Transactive response-DNA-binding-Protein 43 (mit einem Molekulargewicht von 43 Kilo-Dalton)
TLS	Total locked-in syndrome
TLS	Translocated in liposarcoma (=FUS)
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon (Thyreotropin)
U	Umdrehungen
UBI	Ubiquitinierte Inklusionen
UBQLN2	Ubiquilin 2
UMN	Upper motor neuron
WFN	World Federation of Neurology
WHO	World Health Organization
Zn	Zink
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)

1.1.1 Definition

Die Amyotrophe Lateralsklerose ist eine neurodegenerative Erkrankung, der ein Funktionsverlust des ersten Motoneurons der Großhirnrinde („Upper motor neuron“, UMN) und des zweiten Motoneurons im Vorderhorn des Rückenmarks bzw. in den motorischen Hirnnervenkernen des Hirnstamms („Lower motor neuron“, LMN) zugrunde liegt (Andersen et al. 2005, Kollewe et al. 2008). Charakteristisch für die ALS ist der fortschreitende Untergang der motorischen Nervenzellen, der sowohl spastische als auch schlaffe Paresen hervorruft und mit einer irreversiblen Atrophie der Skelettmuskulatur einhergeht (Brooks 1994, Brooks et al. 2000).

1.1.2 Name

Der aus dem Griechischen bzw. Lateinischen abgeleitete Name (a=Fehlen, myo=Muskel, troph=den Ernährungszustand betreffend, lateral=seitlich, Sklerose=Verhärtung [des Rückenmarks]) wurde 1874 von dem französischen Neurologen Jean-Martin Charcot (1825-1893) geprägt (Rowland 2001) (s. Abb. 1).

In der Literatur wird die ALS gelegentlich auch als Amyotrophische oder Myatrophe Lateralsklerose sowie Charcot-Krankheit bezeichnet. In der englischsprachigen Literatur sind die Begriffe „Amyotrophic lateral sclerosis“, „Lou Gehrig's disease“[1] und „Motor neuron disease“ (MND) gebräuchlich, wobei letzterer häufig in einem umfassenderen Sinn verwendet wird.

1.1.3 Klassifikation

Die ALS wird in der „Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme“ (ICD) in Kapitel VI (Krankheiten des Nervensystems) in die Untergruppe G12 (Spinale Muskelatrophie und verwandte Syndrome) der Gruppe G10-14 (Systematrophien, die vorwiegend das

[1] Heinrich Ludwig „Lou“ Gehrig (1903-1941), Sohn deutscher Einwanderer, war einer der erfolgreichsten amerikanischen Baseballspieler aller Zeiten. 1939 wurde bei ihm die ALS diagnostiziert. Er erlag der Krankheit zwei Jahre später im Alter von nur 37 Jahren. Seither wird die ALS, insbesondere in der nichtwissenschaftlichen englischsprachigen Literatur, auch „Lou Gehrig's Disease“ genannt (Eig 2005).

Zentralnervensystem betreffen) unter G 12.2 (Motoneuronkrankheit) eingeordnet (Graubner 2012).

1.1.4 Geschichte

Der englische Anatom und Physiologe Charles Bell (1774-1842), der bereits 1811 den funktionellen Unterschied zwischen den aus dem Hinterhorn und dem Vorderhorn des Rückenmarks austretenden Nerven (dorsale und ventrale Rückenmarkswurzel) erkannt hatte (Bell 1811), beschrieb 1830 in „The nervous system of the human body“ zum ersten Mal ein Krankheitsbild, das er „Progressive muscular atrophy“ (PMA) nannte und das weitgehend die Symptome der später als Amyotrophe Lateralsklerose bezeichneten Erkrankung aufwies (Bell 1830). Fraglich ist, ob die ALS zu Beginn des 19. Jahrhunderts erstmals auftrat oder ob nur deren Erstbeschreibung in diese Zeit fällt. Ein Grund für die späte Erstbeschreibung könnte neben der niedrigen Prävalenz bei einer geringen Lebenserwartung vor dem 19. Jahrhundert das hohe Manifestationsalter der Erkrankung sein.

In der Folgezeit stellten Aran, Duchenne de Boulogne und Cruveilhier Beobachtungen ähnlicher Symptome zusammen (Aran 1850, Cruveilhier 1853, Duchenne de Boulogne 1851). Erstmals vollständig beschrieben wurde die Krankheit in den Jahren 1869 bzw. 1873/1874 von Charcot[2]. Charcot gab der Krankheit auch ihren Namen, „Sclérose latérale amyotrophique"(SLA), den er aufgrund seiner Entdeckungen, einer Muskelatrophie und einer Sklerosierung der Seitenstränge des Rückenmarks, wählte.

Abbildung 1: Jean-Martin Charcot

(Quelle: http://www.uniklinik-ulm.de/struktur/kliniken/neurologie/home/klinik/charcot-stiftung.html)

[2] Jean-Martin Charcot (1825-1893) wird heute zusammen mit Guillaume Benjamin Amand Duchenne de Boulogne (1806-1875) als Begründer der modernen Neurologie angesehen.

Präzise schilderte Charcot das Krankheitsbild und den Krankheitsverlauf von nur ein bis drei Jahren. Außerdem konnte er zeigen, dass sowohl die graue Substanz der Großhirnrinde als auch die graue Substanz des Rückenmarks von einem Verlust an Nervenzellen betroffen waren (Charcot 1873, Charcot 1874, Charcot et Joffroy 1869).

Obwohl Charcot nicht der eigentliche Erstbeschreiber war, gilt er heute als „Entdecker“ der ALS. Die grundlegende Bedeutung seiner Beiträge für das Verständnis der ALS spiegelt sich in der Tatsache wider, dass die Krankheit in großen Teilen Europas, vor allem aber in den französischsprachigen Teilen der Welt, heute noch „Maladie de Charcot“ genannt wird.

1.1.5 Epidemiologie

Die ALS tritt weltweit auf, ist jedoch eine seltene Erkrankung. Die Inzidenz beträgt 1,5 bis 2,7 auf 100.000 Menschen pro Jahr. Damit ist die ALS die häufigste Motoneuronerkrankung. Die Angaben für die Prävalenz schwanken zwischen 2,7 bis 7,4 auf 100.000 Menschen. Männer erkranken häufiger als Frauen (Geschlechterverhältnis 1,5:1). Dies gilt allerdings nur für die sporadische (sALS) nicht aber die familiäre Form der ALS (fALS). Die Mortalität liegt zwischen 1,5 bis 2,5 auf 100.000 Menschen pro Jahr. In den letzten Jahrzehnten ist eine stetige Zunahme sowohl der Inzidenz als auch der Mortalität der ALS zu verzeichnen, wobei dies insbesondere für südeuropäische Länder, das weibliche Geschlecht und Menschen älter als 75 Jahre gilt. Gründe dafür scheinen neben einer höheren Lebenserwartung, die verbesserte Diagnostik sowie Krankheitsdefinition seit der Einführung der El Escorial-Diagnosekriterien bzw. der ICD-Klassifikation und eine genauere Todesstatistik zu sein. Andere Einflüsse, wie z.B. Umweltfaktoren, können dabei nicht ausgeschlossen werden (Brooks 1994, Brooks et al. 2000, Graubner 2012, Soriani et Desnuelle 2009, Worms 2001).

Die meisten Erkrankungen treten sporadisch auf (sporadische ALS), nur etwa 5 bis 10% aller Erkrankungsfälle sind genetisch bedingt (familiäre ALS) und unterliegen meist einem autosomal-dominanten Erbgang mit hoher Penetranz (Andersen et al. 2006, Emery and Holloway 1982, Kurland and Mulder 1955, Mulder et al. 1986).

In den letzten Jahren wurden allerdings Mutationen verschiedener Gene bei bisher als sporadisch angenommenen Erkrankungsfällen gefunden, wahrscheinlich

Neumutationen, sodass die Anzahl genetisch bedingter Erkrankungsfälle vermutlich höher liegt.

Das mittlere Erkrankungsalter für die sporadische Form liegt zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr. Die familiäre Form weist einen etwa zehn Jahre früheren Erkrankungsbeginn auf. Darüber hinaus existiert eine seltene juvenile Form der ALS (jALS), bei der die Erkrankung bereits vor dem 25. Lebensjahr auftritt und meist einem autosomal-rezessiven Erbgang unterliegt (Wijesekera and Leigh 2009). Das Risiko, an ALS zu erkranken, ist somit für Menschen mit männlichem Geschlecht, fortgeschrittenem Alter und genetischer Disposition am größten (Andersen et al. 2005, Kollewe et al. 2008).

Hinsichtlich der Erkrankungshäufigkeit gibt es eine vor allem für die Forschung relevante Besonderheit. Bei einer Variante der ALS, dem sogenannten ALS-Parkinson-Demenz-Komplex, die auf bestimmten Inseln im pazifischen Raum (z.B. Guam und Süd-West-Neuguinea) vorkommt, ist die Prävalenz verglichen mit der weltweiten Prävalenz 50- bis 100-mal höher. Die Ursache für die höhere Prävalenz ist unklar, genetische Faktoren können genauso wie Umweltfaktoren nicht ausgeschlossen werden (Koerner 1952, Kurland and Mulder 1954).

Eine Häufung von Erkrankungsfällen wurde darüber hinaus bei Fußballspielern ermittelt. Eine Studie der Universität Pavia erbrachte bei italienischen Fußballprofis ein erhöhtes Erkrankungsrisiko vor dem 49. Lebensjahr, was für die Hypothese spricht, dass vermehrte körperliche Aktivität einen Risikofaktor für die ALS darstellt (Chiò et al. 2005).

1.1.6 Krankheitsbild

Auf Grundlage der klinischen Symptomatik ist keine Unterscheidung zwischen der familiären und der sporadischen Form der ALS möglich (Emery and Holloway 1982).

Das klinische Bild sowohl der familiären als auch der sporadischen Form der ALS ist gekennzeichnet durch ein Nebeneinander von spastischen und schlaffen Paresen der Skelettmuskulatur, welche durch die Degeneration des ersten und zweiten Motoneurons bedingt sind. Dabei ruft die Degeneration des ersten Motoneurons spastische und die des zweiten Motoneurons schlaffe Paresen hervor (Brooks 1994, Brooks et al. 2000).

Im Anfangsstadium der ALS treten zunächst unspezifische Symptome wie Muskelkrämpfe und Faszikulationen auf. Erst im weiteren Verlauf zeigen sich die

typischen Muskelatrophien sowie schlaffe und spastische Paresen, wodurch sowohl manuelle Tätigkeiten als auch das Gangbild beeinträchtigt werden. Gleichzeitig nehmen die Faszikulationen wieder ab. Meist beginnt die Erkrankung fokal und breitet sich kontinuierlich auf benachbarte Körperregionen aus. Häufig sind zunächst die kleinen Handmuskeln (30-40%) oder die untere Extremität (30-40%) betroffen. Seltener ist initial die Zungen-, Schlund- und Gaumenmuskulatur (25%) befallen (progressive Bulbärparalyse), was mit Artikulations- (Dysarthrie), Kau- und Schluckstörungen (Dysphagie) einhergeht. Dazu kommen Symptome emotionaler Labilität wie pathologisches Gähnen, Lachen oder Weinen (Pseudobulbärparalyse) (Ludolph 2006, Wijesekera and Leigh 2009). Wenn die Krankheit mit bulbären Symptomen beginnt, kommt es entweder gleichzeitig oder aber häufiger innerhalb der folgenden ein bis zwei Jahre zum Befall der Extremitätenmuskulatur. Dagegen tritt bei primärem Befall der Extremitätenmuskulatur die bulbäre Symptomatik fast immer erst zu einem späteren Zeitpunkt auf (Wijesekera and Leigh 2009). Im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium führt die Beteiligung der Zwerchfellmuskulatur zu einer Atemschwäche (respiratorische Insuffizienz), die häufig Komplikationen wie eine alveoläre Hypoventilation mit CO_2-Intoxikation und respiratorische Infektionen verursacht und damit die Hauptursache für den tödlichen Verlauf der ALS darstellt (Ludolph 2006).

Obwohl die ALS als Erkrankung des motorischen Systems gilt, sind in vielen Fällen kognitive Beeinträchtigungen und Überlappungen mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie einer Demenz oder dem Parkinson-Syndrom, nachweisbar (Hudson 1981, Körner et al. 2012). Dabei ist die Assoziation der ALS mit einer Demenz vom frontotemporalen Typ (FTD), bedingt durch frontotemporale Lobärdegeneration (FTLD), besonders auffällig (Lomen-Hoerth et al. 2002, Neary et al. 1990).

Störungen der Sensibilität, der Sphinktermuskulatur, des vegetativen Systems und der Okulomotorik gehören hingegen nicht zum Krankheitsbild (Brooks 1994, Brooks et al. 2000). Allerdings wurden Erkrankungsfälle beschrieben, bei denen durch eine Beatmung mithilfe eines Tracheostomas die respiratorische Insuffizienz überlebt wurde und eine vollständige Paralyse der gesamten willkürlich innervierten Muskulatur einschließlich der Augenmuskulatur auftrat. Dieser Zustand, in dem die Patienten keine Möglichkeit mehr haben mit der Außenwelt zu kommunizieren,

obwohl sie bei völligem Bewusstsein sind, wird als „Total locked-in syndrome“ (TLS) bezeichnet (Hayashi and Kato 1989).

1.1.7 Krankheitsverlauf

Die ALS verläuft individuell sehr unterschiedlich aber immer progredient ohne Remission oder Heilung (Ludolph 2006). Die mittlere Überlebenszeit nach Symptombeginn liegt bei der sporadischen Form der ALS bei drei bis fünf Jahren für Erkrankungsfälle mit primärem Extremitätenbefall und bei zwei bis drei Jahren für Erkrankungsfälle mit primärem bulbären Befall (Wijesekera and Leigh 2009). Allerdings wurden in etwa 5% der Erkrankungsfälle, insbesondere bei der juvenilen Form der ALS, auch Krankheitsverläufe von mehr als zehn Jahren beobachtet, sodass eine Vorhersage über den Erkrankungsverlauf einzelner Patienten schwierig ist. Bei der familiären Form der ALS ist der Krankheitsverlauf mit etwa einem Jahr wesentlich kürzer (Emery and Holloway 1982).

Neben dem Alter bei Symptombeginn scheinen unterschiedliche Faktoren die Prognose zu beeinflussen. Dazu gehören das klinische Erscheinungsbild, die primär befallene Körperregion, der Zeitraum zwischen Symptombeginn und Diagnose, die Vitalkapazität, die El Escorial-Kategorie und der Einsatz des Medikaments Riluzol (Brooks 1994, Brooks et al. 2000, Wijesekera and Leigh 2009). Die Suche nach einem Biomarker (z.B. Laborwert, Genmutation), der eine verlässliche Aussage über den Krankheitsverlauf und die Prognose ermöglicht, war bisher erfolglos.

1.1.8 Diagnostik

Die Diagnostik bei der ALS stützt sich in erster Linie auf klinische Kriterien wie Anamnese und neurologische Untersuchung und sollte durch elektrophysiologische Untersuchungen (Elektromyographie, EMG, und Elektroneurographie, ENG) ergänzt werden (AWMF-Leitlinien 2008, De Carvalho et al. 2008). Eine ausführliche neurologische Untersuchung bildet vor allem durch den Nachweis erhaltener Muskeleigenreflexe bei gleichzeitigem Vorliegen von schlaffen Paresen die Grundlage für die Diagnosefindung (Ludolph 2006). Bei der elektromyographischen Untersuchung lassen sich die Funktionsstörung des zweiten Motoneurons mit der daraus resultierenden Denervierung der zugehörigen Muskulatur und pathologische Faszikulationspotentiale nachweisen. Dagegen zeigt sich bei der elektroneuro-

graphischen Untersuchung (Nervenleitgeschwindigkeit) meist ein unauffälliger Befund. Diese dient daher vorrangig dem Ausschluss anderer Erkrankungen.

Daneben sollten eine Basislabordiagnostik (Differentialblutbild, Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), C-reaktives Protein (CRP), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Laktat-Dehydrogenase (LDH), Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH), freies Trijodthyronin (fT3), freies Tetrajodthyronin (fT4), Vitamin B_{12}, Folsäure, Creatinkinase (CK), Kreatinin, Elektrolyte und Glukosespiegel) sowie eine Basisbildgebung (Röntgen-Thorax, Magnetresonanztomographie (MRT), und Computertomographie (CT)) erfolgen. Eine genetische Untersuchung (z.B. des *Superoxiddismutase 1 (SOD1)*-Gens) ist zurzeit nur bei Patienten mit positiver Familienanamnese sinnvoll.

Weitergehende Diagnostik wird zur differentialdiagnostischen Abgrenzung der ALS gegenüber ALS-ähnlichen Krankheitsbildern (z.B. zervikale Myelopathie) empfohlen. Dabei können zusätzliche Laboruntersuchungen (z.B. Serologie), eine Liquordiagnostik oder in seltenen Fällen auch eine Muskelbiopsie hilfreich sein (AWMF-Leitlinien 2008).

Die „World Federation of Neurology“ (WFN) entwickelte 1994 die El Escorial-Kriterien als Diagnosekriterien für die ALS (Brooks 1994). Diese wurden 2000 revidiert (Brooks et al. 2000) und werden im Rahmen wissenschaftlicher Studien zur Klassifikation von Patienten eingesetzt (s. Abb. 2). Im klinischen Alltag spielen die El Escorial-Kriterien jedoch nur eine untergeordnete Rolle, da sie sehr restriktiv und damit für eine frühe Diagnosestellung hinderlich sind (AWMF-Leitlinien 2008).

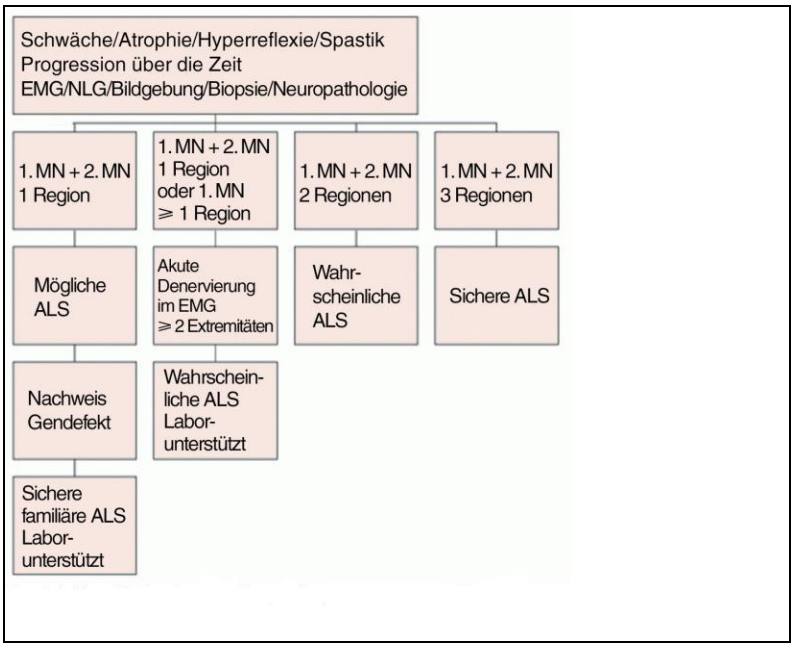


Abbildung 2: Diagnosestellung nach den El Escorial-Kriterien

modifiziert nach Schmalbach et al. (2010)

1.1.9 Ätiologie

Die Ätiologie der ALS ist weitgehend unbekannt. Bei der familiären ALS wurden verschiedene Mutationen im Gen des Proteins Kupfer-/Zink-Superoxiddismutase 1 (Cu/Zn-SOD 1) auf Chromosom 21 gefunden. Allerdings sind solche Mutationen nur in etwa 10 bis 20% der familiären ALS-Erkrankungsfälle nachweisbar und machen nur 1 bis 2% aller ALS-Erkrankungsfälle aus (Rosen et al. 1993). Trotz der geringen Häufigkeit der familiären ALS hat diese eine grundsätzliche Bedeutung für die Aufklärung von Ätiologie und Pathogenese der ALS, da angenommen wird, dass Erkenntnisse hinsichtlich der pathophysiologischen Mechanismen bei der familiären ALS auch für das Verständnis der Pathophysiologie der sporadischen ALS relevant sind.

In den letzten Jahren wurden weitere fALS-assoziierte Mutationen verschiedener Gene entdeckt. Darunter waren Mutationen im Gen des „Transactive response-DNA-binding“-Proteins 43 (TDP-43) auf Chromosom 1, die nicht nur bei der familiären sondern auch bei der sporadischen ALS gefunden wurden und in etwa 4% der fALS- und 1,5% der sALS-Erkrankungsfälle nachweisbar sind (Kabashi et al. 2008, Sreedharan et al. 2008).

Außerdem gehörten dazu Mutationen im Gen des Proteins FUS/TLS („Fused in sarcoma“/„Translocated in liposarcoma“) auf Chromosom 16, die in etwa 5% der fALS-Erkrankungsfälle nachweisbar sind (Kwiatkowski Jr. et al. 2009, Vance et al. 2009).

Darüber hinaus wurden Mutationen im Gen des Proteins Ubiquilin 2 (UBQLN2) als Ursache für X-chromosomal-dominant erbliche ALS- bzw. ALS-Demenz-Formen (Deng et al. 2011) sowie die Expansion eines nichtkodierenden GGGGCC-Hexanukleotid-Repeats im *C9ORF72*-Gen als häufigste Ursache von Chromosom 9p21-assoziierter frontotemporaler Demenz sowie ALS beschrieben (DeJesus-Hernandez et al. 2011, Renton et al. 2011).

Im Jahr 2012 wurden Mutationen im *Profilin 1 (PFN1)*-Gen in einen ursächlichen Zusammenhang mit der familiären ALS gebracht. Damit sind in etwa 50% der fALS-Erkrankungsfälle die genetischen Faktoren bekannt (Wu et al. 2012).

1.1.10 Pathogenese

Die Pathogenese der ALS ist ebenfalls noch unklar, allerdings gibt es verschiedene Hypothesen, bei denen unterschiedliche Mechanismen für die Degeneration der Motoneurone diskutiert werden. Im Folgenden werden nur die bei der vorliegenden Studie im Vordergrund stehende Proteinaggregationshypothese und damit zusammenhängende Aspekte beschrieben.

1.1.10.1 Proteinaggregationshypothese

Die Stabilität und Funktionalität eines Proteins hängt von dessen definierter dreidimensionaler Struktur (Tertiärstruktur) ab, die auch als native Struktur bezeichnet wird. Die grundlegenden Informationen für die korrekte Faltung eines Proteins sind durch deren Aminosäuresequenz (Primärstruktur) determiniert, werden aber von dem zellulären Milieu, in dem die Faltung stattfindet, beeinflusst. Die Proteinfaltung kann cotranslational im Zytoplasma aber auch posttranslational im Zytoplasma oder anderen Zellkompartimenten wie den Mitochondrien oder dem Endoplasmatischem Retikulum (ER) stattfinden.

Bei der Qualitätskontrolle von Proteinen, zu der alle zellulären Mechanismen gehören, die für die korrekte Faltung und damit Funktion der Proteine verantwortlich sind, ist die Ausbildung der Primärstruktur eines Proteins bereits ein wichtiger Faktor. Entsprechend ist das Risiko für eine Fehlfaltung erhöht, wenn die

Aminosäuresequenz aufgrund von Mutationen in den Genen, die für die Aminosäuren kodieren, verändert ist.

Neben der Aminosäuresequenz gibt es noch andere Faktoren bei der Qualitätskontrolle von Proteinen, wobei den Chaperonen die größte Bedeutung zukommt. Chaperone, die auch Hitzeschockproteine (HSP) genannt werden, sind in allen Zellkompartimenten zu finden. Eine wichtige Komponente des Chaperonsystems sind die HSP70-Proteine. Diese verhindern Interaktionen der Proteine mit anderen Molekülen, wie z.B. Aggregatbildungen inkomplett gefalteter Proteine, die während des Faltungsprozesses hydrophobe Strukturen exponieren, die in der nativen Struktur nicht exponiert werden. Zellulärer Stress, der mit einer Störung der Proteinfaltung bzw. einer vermehrten Aggregatbildung einhergeht, führt zu einer Erhöhung der Konzentration der Chaperone. Daher stammt auch deren Bezeichnung als Hitzeschockproteine (Berg et al. 2012, Dobson 2003, Voet and Voet 2011).

Darüber hinaus ist das Ubiquitin-Proteasom-System an der Qualitätskontrolle von Proteinen beteiligt. Das Ubiquitin-Proteasom-System stellt abgesehen von den Lysosomen den Hauptabbauweg von Proteinen dar. Insbesondere kurzlebige, fehlgefaltete oder beschädigte Proteine, die zuvor durch das Anhängen von Polyubiquitinketten markiert wurden (Ubiquitinierung), werden von dem Proteasom[3], einem zu den Proteasen zählenden Proteinkomplex, in Fragmente zerlegt. Ubiquitin, das seinen Namen aufgrund seines ubiquitären Vorkommens in allen eukaryotischen Zellen erhielt, ist ein Protein, das durch die Bindung an Proteine, deren Eigenschaften verändert (posttranslationale Modifikation) und damit nicht nur für den Proteinabbau sondern auch für die Funktion sowie die Verteilung von Proteinen innerhalb der Zelle von entscheidender Bedeutung ist (Berg et al. 2012, Shoesmith Berke and Paulson 2003, Voet and Voet 2011).

Die Proteinfaltung ist also ein sehr komplexer Prozess, der verschiedenen Mechanismen der Qualitätskontrolle unterliegt, wodurch einerseits Fehlfaltungen der Proteine verhindert und andererseits fehlgefaltete Proteine abgebaut werden sollen. Dennoch kommt es unter bestimmten Umständen zu einer Fehlfaltung von Proteinen

[3] Das 26S-Proteasom von Eukaryoten besteht aus drei Untereinheiten, einer 20S-Untereinheit und zwei 19S-Untereinheiten, die wiederum aus mehreren Proteinen zusammengesetzt sind.

und nachfolgend zu einer Aggregation der fehlgefalteten Proteine, die eine Ursache von zellulärer Fehlfunktion und damit von Krankheit sein kann (Dobson 2003).

Die Proteinaggregationshypothese besagt, dass bei der ALS wie auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen[4] die Fehlfaltung, Aggregation und Akkumulation von verschiedenen Proteinen die Ursache für den Nervenzelluntergang darstellt und damit entscheidend für die Pathogenese ist (Soto 2003).

Für diese Hypothese spricht, dass pathologische Proteinaggregate bei diesen Erkrankungen hauptsächlich in den Bereichen des ZNS gefunden wurden, die bei der jeweiligen Erkrankung von einem Nervenzelluntergang betroffen sind (Soto and Estrada 2008). Bei der ALS sind das vor allem die motorischen Nervenzellen in Großhirn, Hirnstamm und Rückenmark sowie die umgebenden Gliazellen (Watanabe et al. 2001).

Zudem erzeugen Mutationen in den Genen, die für die aggregierenden Proteine kodieren, erbliche Erkrankungsformen, die mit einem früheren Erkrankungsbeginn sowie schwereren Phänotyp als die sporadischen Erkrankungsformen einhergehen (Soto 2001). Die familiäre Form der ALS wird unter anderem durch Mutationen im Gen des Proteins SOD1 hervorgerufen (Rosen et al. 1993).

Außerdem zeigte sich, dass transgene Tiere, die das mutierte humane Gen für das aggregierende Protein exprimieren, die typischen klinischen und neuropathologischen Zeichen der humanen Erkrankung entwickeln (Price et al. 1998, Price et al. 2000). *HSOD1*-transgene Mäuse[5], die das mutierte humane Gen für die SOD1 exprimieren, erkranken an einer der humanen ALS ähnlichen Motoneuronerkrankung (*hSOD1*-Mausmodell der ALS) (Gurney 1994).

Des Weiteren stellte sich heraus, dass Proteinaggregate in vitro neurotoxisch sind. Dies gilt allerdings nicht nur für Aggregate, die aus krankheitsassoziierten Proteinen bestehen, sondern auch für Aggregate aus nicht-krankheitsassoziierten Proteinen (Bucciantini et al. 2002). Die Neurotoxizität von Proteinaggregaten, die mutierte Formen der SOD1 (mSOD1) enthalten, wurde in Zellkulturmodellen für die ALS nachgewiesen (Durham et al. 1997).

[4] Zu den neurodegenerativen Erkrankungen zählen die Alzheimer-, Parkinson-, Huntington- und Prionerkrankung sowie die Amyotrophe Lateralsklerose.

[5] *HSOD1*-transgenen Mäusen wurde gezielt eine mutierte Form des humanen *SOD1*-Gens in das Erbgut eingebracht.

Sowohl die familiären als auch die sporadischen Formen der ALS sind durch intrazelluläre Proteinaggregate gekennzeichnet, die sich in ihrer Zusammensetzung jedoch voneinander unterscheiden (Leigh et al. 1991). Das Protein SOD1 ist der Hauptbestandteil der Proteinaggregate bei der familiären Form der ALS (Shibata et al. 1993), während das Protein TDP-43 den Hauptbestandteil der Proteinaggregate bei der sporadischen Form der ALS darstellt (Arai et al. 2006). Daneben enthalten die Aggregate beider ALS-Formen weitere Proteinkomponenten wie Ubiquitin und Neurofilamente (Shibata et al. 1996). Wie es zur Bildung der Proteinaggregate kommt, ist noch unklar, aber es gilt als sicher, dass eine fehlerhafte Faltung der Proteine dabei eine Rolle spielt (Chattopadhyay and Valentine 2009). Offen sind weiterhin die Fragen, wie die Proteinaggregate zum Untergang der Nervenzellen führen bzw. ob sie überhaupt die Ursache dafür sind oder lediglich die Endstrecke unterschiedlicher Pathomechanismen darstellen. Die Proteinaggregate könnten auch nur eine Begleiterscheinung des Nervenzelluntergangs oder zumindest anfänglich protektiv für die Nervenzellen sein, indem fehlgefaltete und somit potentiell schädliche Proteine aus den Stoffwechselvorgängen der Zellen entfernt werden (Lansbury and Lashuel 2006).

1.1.10.2 Proteine

1.1.10.2.1 SOD1

Die Cu-/Zn-Superoxiddismutase 1 (Cu/Zn-SOD1)[6] ist ein Metalloenzym, das hauptsächlich im Zytoplasma von allen eukaryotischen Zellen zu finden ist und etwa 1% aller Proteine im ZNS ausmacht (Crapo et al. 1992). Die SOD1 katalysiert die enzymatische Umwandlung von Superoxidionen, einer reaktiven Sauerstoffspezies („Reactive oxygen species“, ROS), in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff ($O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$) und ist somit antioxidativ wirksam (McCord and Fridovich 1969, McCord and Fridovich 1988). Das Protein besteht aus 153 Aminosäuren und ist ein Homodimer[7], bei dem jede Untereinheit ein stabilisierendes Zink-Ion sowie ein für die enzymatische Aktivität bedeutsames Kupfer-Ion enthält.

[6] Neben der SOD1 gibt es noch zwei weitere Typen von Superoxiddismutasen im menschlichen Organismus: die mitochondriale Mangan-Superoxiddismutase 2 (Mn-SOD, SOD2) und die extrazelluläre Superoxiddismutase 3 (SOD3).

[7] Ein Homodimer ist ein Molekül, das aus zwei identischen Untereinheiten (Monomeren) besteht.

Im Jahr 1993 wurden erstmals Mutationen im *SOD1*-Gen auf Chromosom 21 mit fünf Exons und vier Introns nachgewiesen und als ursächlich für die ALS identifiziert (Rosen et al. 1993). Bei den Mutationen handelt es sich überwiegend um „Missense“-Mutationen, also Punktmutationen mit einem Basenaustausch (Substitution), die zur Kodierung anderer Aminosäuren führen (Deng et al. 1993). Inzwischen wurde für mehr als 100 verschiedene Mutationen ein Zusammenhang mit der ALS beschrieben. Es wird vermutet, dass diese Mutationen einen toxischen Funktionsgewinn der SOD1 bedingen („Gain of function“-Hypothese), der unabhängig von deren antioxidativen Eigenschaften ist („Loss of function“-Hypothese). Dabei ist unklar, warum trotz des ubiquitären Vorkommens der SOD1 deren angenommene Toxizität nur in bestimmten Bereichen des ZNS Auswirkungen auf das Überleben von Nervenzellen hat.

Für die „Gain of function“-Hypothese spricht, dass die verschiedenen Mutationen unterschiedliche enzymatische Aktivitäten und Stabilitäten der mutierten SOD1-Untereinheiten hervorrufen, die keinen Einfluss auf die Aktivität oder Stabilität der Wildtyp-Untereinheiten haben (Borchelt et al. 1995). Einige Mutationen gehen mit einer nahezu normalen enzymatischen Aktivität und Stabilität der SOD1-Untereinheiten einher. Bei ALS-Patienten sowie bei *hSOD1*-transgenen Mäusen, die solche Mutationen aufweisen, kommt es aber gleichermaßen zur Ausprägung der ALS bzw. einer der humanen ALS ähnlichen Motoneuronerkrankung wie bei ALS-Patienten bzw. *hSOD1*-transgenen Mäusen, die Mutationen aufweisen, welche mit einer reduzierten enzymatischen Aktivität und/oder Stabilität der SOD1 einhergehen. Heterozygote *hSOD1*-transgene Mäuse bzw. ALS-Patienten exprimieren allerdings neben der mutierten SOD1 noch enzymatisch normal aktive Wildtyp-SOD1 (Borchelt et al. 1994).

Die Erkenntnis, dass *SOD1*-defiziente Mäuse ohne jegliche SOD1-Aktivität keine Motoneuronerkrankung entwickeln, spricht weiterhin für die „Gain of function“- und gegen die „Loss of function“-Hypothese. Die SOD1 scheint demzufolge unter physiologischen Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle für das Überleben von Motoneuronen zu spielen. Bei erhöhtem neuronalem Stress nach Axotomie konnte allerdings ein signifikant höherer Motoneuronenverlust bei *SOD1*-defizienten als bei Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden, sodass die SOD1 für Motoneurone, die

Stress ausgesetzt sind, widerum eine wesentliche Bedeutung zu haben scheint (Reaume et al. 1996).

SOD1-positive Inklusionen[8] in Motoneuronen und Astrozyten des Rückenmarks sind ein frühes Merkmal der SOD1-assoziierten familiären ALS (Shibata et al. 1993), die auch im *hSOD1*-Mausmodell beobachtet werden können (Brujin et al. 1997). Solche Inklusionen wurden nicht nur in Zytoplasma, Dendriten und Axonen sondern auch in den Mitochondrien der Zellen gefunden (Deng et al. 2006). Sie bestehen aus Proteinaggregaten, die sowohl die mutierte als auch die Wildtyp-Form der SOD1 und weitere Proteinkomponenten wie Ubiquitin, Hitzeschockprotein 70 (HSC70)[9] und die 20S-Untereinheit des Proteasoms, wichtige Faktoren der Proteinqualitätskontrolle, sowie phosphorylierte Neurofilamente enthalten. Die 20S-Untereinheit des Proteasoms konnte allerdings nicht bei der humanen ALS sondern nur im *hSOD1*-Mausmodell nachgewiesen werden (Shibata et al. 1996, Watanabe et al. 2001).

Die Aggregatbildung scheint die Folge einer Fehlfaltung der mutierten SOD1 zu sein. Sowohl bei der familiären Form der ALS als auch bei *hSOD1*-transgenen Mäusen waren in Motoneuronen fehlgefaltete Formen der SOD1 nachweisbar (Rakhit et al. 2007). Diese waren durch ein entfaltetes β-Faltblatt, einen exponierten hydrophoben Kern sowie eine gestörte Dimerisierung gekennzeichnet und bildeten ungeordnete, amorphe Aggregate aber keine amyloiden Strukturen wie die fehlgefalteten Proteine bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. der Alzheimer-Erkrankung (Kerman et al. 2010). Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Fehlfaltung sowie der Aggregation der SOD1 auf der einen und der Motoneuronendegeneration auf der anderen Seite konnte bisher allerdings noch nicht bewiesen werden. Für einen solchen Zusammenhang spricht jedoch, dass die Proteinaggregate zu den frühesten pathologischen Veränderungen in den Motoneuronen gehören und der Degeneration der Motoneurone vorausgehen. Darüber hinaus besteht im *hSOD1*-Mausmodell eine hohe Korrelation zwischen der Bildung von SOD1-Aggregaten und dem Auftreten motorischer Symptome (Chattopadhyay and Valentine 2009).

Auch bei der sporadischen Form der ALS finden sich SOD1-positive Inklusionen (Shibata et al. 1994), in denen allerdings keine fehlgefalteten Formen der Wildtyp-

[8] SOD1-positive Inklusionen reagieren positiv mit Antikörpern für die humane SOD1.

[9] HSC70 ist eine konstitutiv exprimierte Isoform des Hitzeschockproteins HSP70, die im Zytoplasma aller Zellen vorkommt.

SOD1 gefunden wurden. Die Fehlfaltung und Aggregation der SOD1 scheint bei der ALS im Unterschied zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. der Alzheimer-Erkrankung, ein spezifisches Merkmal der SOD1-assoziierten, familiären ALS zu sein. Bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen sind sowohl die sporadischen als auch die familiären Formen mit der Fehlfaltung und Aggregation eines bestimmten Proteins verbunden.

Die Ubiquitin- oder TDP-43-positiven Inklusionen bei der sporadischen Form der ALS enthielten jedoch wie die SOD1-positiven Inklusionen fehlgefaltete Proteine und bildeten ebenfalls ungeordnete, amorphe Aggregate aber keine amyloiden Strukturen (Kerman et al. 2010). Da die Bedeutung der SOD1-positiven Inklusionen bei der sporadischen Form der ALS noch nicht ausreichend untersucht wurde, kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die SOD1 über die SOD1-assoziierte, familiäre Form der ALS hinaus für die Pathogenese der ALS relevant ist.

1.1.10.2.2 TDP-43

Schon lange ist bekannt, dass intrazytoplasmatische ubiquitinierte Inklusionen (UBI) ein pathologisches Merkmal der ALS sind (Leigh et al. 1991). Deren molekulare Zusammensetzung war allerdings bis vor wenigen Jahren noch unklar. Mittlerweile konnte das Protein TDP-43 („Transactive response-DNA-binding“-Protein mit einem Molekulargewicht von 43 Kilo-Dalton (kDa)) als Hauptbestandteil der UBI identifiziert werden (Arai et al. 2006). Außerdem zeigte sich, dass UBI bei der sporadischen und bei der familiären ALS gleichermaßen vorkommen, bei der SOD1-assoziierten, familiären ALS aber fehlen (Mackenzie et al. 2007). Bemerkenswert ist, dass UBI ebenfalls ein pathologisches Merkmal der frontotemporalen Lobärdegeneration mit Ubiquitininklusionen (FTLD-U) sind (Neumann et al. 2006). Nachdem eine klinische Überlappung zwischen der FTLD-U und der ALS bereits beschrieben worden war (Lomen-Hoerth et al. 2002), konnte damit auch eine pathologische Überlappung nachgewiesen werden.

TDP-43 ist ein nukleäres Protein, das 1993 erstmals als Modulator der HIV („Human immunodeficiency virus“) 1-Genexpression durch Bindung an TAR-DNA („Transactive response-DNA“), einem regulatorischen Element im *HIV-1*-Gen, identifiziert wurde (Ou et al. 1995). Nachfolgende Forschungen zeigten, dass TDP-43 zudem modulatorisch beim alternativen Splicing des „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulators“ (CFTR) beteiligt ist (Buratti et al. 2001). Seit 2008 wurden

mehr als 30 verschiedene Mutationen im *TDP-43*-Gen auf Chromosom 1 nicht nur bei der familiären sondern auch bei der sporadischen Form der ALS gefunden. Die Mutationen führen zu einer Fragmentierung und Hyperphosphorylierung von TDP-43 sowie zu einer Verschiebung aus dem Nukleus ins Zytoplasma der Nervenzellen, wo es zur Akkumulation der hyperphosphorylierten TDP-43-Fragmente und Bildung von Proteinaggregaten kommt (Arai et al. 2006, Neumann et al. 2006).

1.1.10.2.3 FUS

Das *FUS-/TLS*-Gen wurde 1993 erstmals als Bestandteil der Translokation t (12;16) beim myxoiden Liposarkom identifiziert (Crozat et al. 1993, Rabbits et al. 1993). Inzwischen wurden mehr als zehn verschiedene Mutationen dieses Gens gefunden, die mit der ALS assoziiert sind. Bei den Mutationen handelt sich wie bei den meisten Mutationen im *SOD1*-Gen vorwiegend um „Missense“-Mutationen. Abgesehen davon weist FUS allerdings mehr Ähnlichkeiten zu TDP-43 auf. FUS ist ebenfalls ein nukleäres Protein, das bei verschiedenen zellulären Vorgängen wie der DNA-Reparatur, Transkriptionsregulation, dem RNA-Splicing und -Transport eine Rolle spielt. Außerdem ist die mutierte Form von FUS genauso wie die mutierte Form von TDP-43 vermehrt im Zytoplasma nachweisbar, akkumuliert dort und bildet Aggregate (Kwiatkowski Jr. et al. 2009, Vance et al. 2009).

1.1.10.2.4 UBQLN2

Im Jahr 2011 wurden Mutationen im *UBQLN2*-Gen, das für ein Ubiquitin-ähnliches Protein, Ubiquilin 2, kodiert, in Zusammenhang mit dominant-erblichen, X-Chromosom-assoziierten ALS- sowie ALS-/Demenzformen beschrieben. Ubiquilin 2 gehört zur Gruppe der Ubiquitine, die für den Abbau ubiquitinierter Proteine verantwortlich sind. Die Mutationen im *UBQLN2*-Gen führen einerseits zu einem gestörten Proteinabbau und bedingen andererseits die Bildung von Ubiquilin 2-positiven-Inklusionen, die darüber hinaus Ubiquitin, TDP43, FUS und andere Proteine aber keine SOD1 enthalten (Deng et al. 2011).

1.1.10.2.5 C9ORF72

Die Expansion eines nichtkodierenden GGGGCC-Hexanukleotid-Repeats im *C9ORF72*-Gen, das für ein bisher nicht näher beschriebenes Protein kodiert, ist 2011 als häufigste Ursache für Chromosom 9p21-assoziierte frontotemporale Demenz sowie ALS identifiziert worden. Damit gehört die ALS zur Gruppe der

nichtkodierenden Repeat-Expansions-Erkrankungen[10]. Die pathophysiologischen Vorgänge, die durch die Repeat-Expansion bedingt sind, sind noch unklar. Diskutiert werden eine Beeinflussung der *C9ORF72*-Transkription und -Expression („Loss-of-function"-Mechanismus) sowie ein RNA-vermittelter „Gain-of-function"-Mechanismus durch die Bildung großer Mengen toxischer RNA (DeJesus-Hernandez et al. 2011, Renton et al. 2011).

1.1.10.2.6 Profilin 1

PFN1 ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, das durch Bindung an Aktinmonomere an deren Polymerisation zu Aktinfilamenten und damit der Ausbildung des Zytoskeletts von Zellen beteiligt ist. Mutationen im *Profilin 1*-Gen auf Chromosom 17p13 wurden 2012 als ursächlich für die familiäre ALS beschrieben. Die Expression einer mutierten Form des PFN1 geht zum einen mit ubiquitinierten Aggregaten, die z.T. auch TDP-43 enthalten, zum anderen mit Veränderungen im zytoskelettalen Stoffwechsel der Zelle einher (Wu et al. 2012).

1.1.10.3 Weitere Hypothesen

Die vorliegenden Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass die Proteinaggregation nicht die einzige Ursache für die Motoneuronendegeneration bei der ALS ist. Ein komplexes Zusammenspiel von unterschiedlichen pathologischen Prozessen scheint bei der Degeneration der Motoneurone eine Rolle zu spielen. Dazu zählen unter anderem Exzitotoxizität, oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion und gestörter axonaler Transport (Shaw 2005).

Der Begriff Exzitotoxizität beschreibt die Schädigung von Nervenzellen infolge einer exzessiven Stimulation postsynaptischer Glutamatrezeptoren (NMDA- und AMPA-Rezeptoren) durch den erregenden Neurotransmitter Glutamat. Dabei kommt es zu einem massiven Calciumeinstrom in die Zellen und zur Aktivierung verschiedener zellschädigender Stoffwechselwege (Shaw 2005). Grundlage für die Annahme, dass dieser Mechanismus an der Motoneuronendegeneration bei der ALS beteiligt sein könnte, waren Beobachtungen, dass ALS-Patienten erhöhte Glutamatkonzentrationen im Liquor (Rothstein et al. 1990) sowie einen verminderten Glutamattransport in Gehirn und Rückenmark aufgrund einer Funktionsstörung des glialen

[10] Zu dieser Gruppe von Erkrankungen gehören außerdem die myotonen Dystrophien, das fragile-X-assoziierte Tremor-/Ataxie-Syndrom und verschiedene spinozerebelläre Ataxien.

Glutamat-Wiederaufnahmetransporters GLT-1 aufweisen (Rothstein et al. 1992, Rothstein et al. 1995). Auch bei *hSOD1*-trangenen Mäusen konnte eine reduzierte Glutamataufnahme im Rückenmark nachgewiesen werden (Canton et al. 1998). Die Erkenntnis, dass der Glutamatantagonist Riluzol sowohl im *hSOD1*-Mausmodell als auch bei ALS-Patienten einen lebensverlängernden Effekt aufweist, stützt die Hypothese, dass die Glutamat-induzierte Toxizität bei der Motoneuronen-degeneration von Bedeutung ist (Bensimon et al. 1994). Interessanterweise besteht hier eine Überlappung zwischen der SOD1-assoziierten und der nicht SOD1-assoziierten ALS, denn es zeigte sich, dass Mutationen im *SOD1*-Gen die Sensitivität der Motoneurone für die Glutamat-induzierte Toxizität vermittelt über AMPA-Rezeptoren erhöhen. Dabei waren die Motoneurone vermehrtem oxidativen Stress durch gesteigerte Radikalproduktion ausgesetzt und wiesen erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen bei entsprechend erniedrigten intra-mitochondrialen Calciumkonzentrationen aufgrund einer Dysfunktion der Mitochondrien auf (Kruman et al. 1999).

Mitochondriale Veränderungen wurden zuvor schon als pathologische Erscheinung bei ALS-Patienten (Sasaki and Iwata 1996) und im *hSOD1*-Mausmodell beschrieben. Diese Veränderungen umfassten eine Schwellung sowie Vakuolisierung der Mitochondrien und Unregelmäßigkeiten der inneren und äußeren Mitochondrien-membran (Dal Canto and Gurney 1994, Dal Canto and Gurney 1995, Kong and Xu 1998, Wong et al. 1995).

Darüber hinaus sind die Akkumulation sowie Aggregation von Neurofilament-proteinen und ein gestörter axonaler Transport mit einer vorzeitigen Atrophie der Axone der Motoneurone bekannte Pathologien bei der ALS (Kong and Xu 1998, Zhang et al. 1997). Sowohl die Inklusionen, die bei ALS-Patienten gefunden wurden als auch die SOD1-positiven Inklusionen im *hSOD1*-Mausmodell enthielten Neurofilamente (Hirano et al. 1984, Tu et al. 1996).

1.1.11 Therapie

Eine kausale Therapie der ALS ist bisher noch nicht möglich. In der Vergangenheit wurden im Rahmen von Studien mehr als 100 verschiedene Substanzen hinsichtlich krankheitsmodifizierender bzw. neuroprotektiver Einflüsse untersucht. Allerdings konnte nur für den Wirkstoff Riluzol sowohl im Tiermodell als auch in der klinischen Erprobung ein lebensverlängernder Effekt nachgewiesen werden (Bensimon et al.

1994). Die zentrale Stellung im Behandlungskonzept der ALS nimmt deshalb die symptomatische Therapie ein. Im Vordergrund stehen dabei die Verbesserung der Lebensqualität und die Erhaltung der Autonomie der Patienten.

1.1.11.1 Neuroprotektive Therapie

Der Begriff Neuroprotektion bezeichnet „eine pharmakologische Intervention zur Verlangsamung der Krankheitsprogression bei degenerativen Erkrankungen des Nervensystems“ (Storch und Ludolph 2003, S. 300). Entscheidend bei einer neuroprotektiven Therapie ist, dass sie so früh wie möglich eingeleitet wird, um dem fortschreitenden Verlust von Nervenzellen entgegenzuwirken (Andersen et al. 2005, Kollewe et al. 2008).

Die einzige für die Therapie der ALS zugelassene Substanz ist der Glutamatantagonist Riluzol. In Studien konnte eine im Mittel um zwei bis drei Monate verlängerte Überlebenszeit mit einer geringen Nebenwirkungsrate (u.a. Müdigkeit, Erhöhung der Transaminasen) bei einer täglichen Gabe von 100 mg Riluzol (Rilutek®) in zwei Einzeldosen von 50 mg über einen Zeitraum von 18 Monaten belegt werden (Bensimon et al. 1994, Lacomblez et al. 1996). Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass in diese Studien lediglich Patienten einbezogen wurden, die jünger als 75 Jahre waren und gemäß den El Escorial-Kriterien eine klinisch „wahrscheinliche“ oder „sichere ALS“ hatten (Brooks 1994, Brooks et al. 2000). Der Mechanismus, der der neuroprotektiven Wirkung von Riluzol zugrunde liegt, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Die Inhibition der glutamatergen Neurotransmission durch Riluzol und die damit verbundene Reduktion der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität scheint dabei aber eine wichtige Rolle zu spielen (Lacomblez et al. 1996).

1.1.11.2 Symptomatische Therapie

Die symptomatische Therapie der ALS umfasst medikamentöse und nicht-medikamentöse Therapieansätze (z.B. Physio-, Ergotherapie, Logopädie) sowie eine frühzeitige Versorgung mit Hilfsmitteln (z.B. Rollstuhl, Halskrawatte). Die meisten Symptome der ALS, wie die anfänglich auftretenden Muskelkrämpfe, Faszikulationen, Spastiken, Schluckstörungen und die damit einhergehende Hypersalivation, Dysarthrie, Dyspnoe, Affektstörungen, psychische Veränderungen wie Depressionen oder Angstzustände sowie Schmerzen, sind behandelbar.

Der Ernährungszustand und die respiratorische Situation der Patienten müssen in der symptomatischen Therapie besonders beachtet werden. Unterernährung bedingt durch Schluckstörungen und die hypermetabole Stoffwechsellage tritt bei bis zu 50% der ALS-Patienten auf und stellt einen unabhängigen Risikofaktor für das Überleben dar (Desport et al. 1999). Daher wird bei einer Gewichtsabnahme sowie Dehydratation oder Aspirationsgefahr die Durchführung einer perkutanen endoskopischen Gastrostomie (PEG), dem Standardverfahren für enterale Ernährung, unter Beachtung der respiratorischen Situation empfohlen (AWMF-Leitlinien 2008). Studien, die einen positiven Einfluss der PEG auf die Lebensqualität oder die Überlebenszeit der Patienten belegen, stehen allerdings noch aus. Eine Verbesserung der respiratorischen Situation der Patienten konnte dagegen nachgewiesen werden (Desport et al. 2000).

Die respiratorische Insuffizienz bei der ALS infolge einer Schwäche der Atemmuskulatur führt zu chronischer alveolärer Hypoventilation, die mit Symptomen wie Dyspnoe, Schlafstörungen und Kopfschmerzen einhergeht und eine nicht-invasive Beatmung erfordert. Daneben können klinische und laborchemische Parameter (Vitalkapazität, Blutgase) als objektive Kriterien zur Indikationsstellung für eine nicht-invasive Beatmung herangezogen werden (AWMF-Leitlinien 2008). In verschiedenen Studien konnte eine Verbesserung der Lebensqualität sowie eine Verlängerung der Überlebenszeit durch eine nicht-invasive Beatmung belegt werden (Bourke et al. 2003, Bourke et al. 2006) Nur bei Versagen einer nicht-invasiven Beatmung sollten invasive Beatmungsverfahren (z.B. Tracheostomie) in Betracht gezogen werden. Außerdem ist in fortgeschrittenen Stadien der ALS eine Pneumonieprophylaxe angezeigt (z.B. durch eine physikalische Therapie mit Atemgymnastik), um respiratorischen Infektionen, die eine häufige Todesursache bei der ALS darstellen, vorzubeugen (AWMF-Leitlinien 2008).

1.2 Experimentelle Therapieforschung

Aufgrund der schlechten Prognose von ALS-Patienten, ohne die Möglichkeit deren Krankheitsverlauf wesentlich beeinflussen zu können, kommt der experimentellen Therapieforschung eine große Bedeutung zu. Dabei besteht die Hoffnung, mit der Etablierung einer effektiven Therapie nicht nur die Prognose von ALS-Patienten deutlich verbessern sondern auch die Frage nach dem Pathomechanismus der ALS beantworten zu können.

1.2.1 *hSOD1*-Mausmodell

Der Nachweis von Mutationen im Gen der Cu/Zn-SOD1 als ursächlichem Faktor bei der familiären Form der ALS war der Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Tiermodells (Rosen et al. 1993, Gurney 1994). Die Zielsetzung bestand darin, neue Erkenntnisse hinsichtlich der Pathogenese der familiären und auch der sporadischen ALS zu gewinnen und auf diese Weise Fortschritte in der Entwicklung einer kausalen Therapie der ALS zu machen. Dazu wurden verschiedene transgene Mausmodelle entwickelt, bei denen die Mäuse eine mutierte Form der humanen SOD1 exprimierten (z.B. G37R und D90A).

Am häufigsten wird die Mutation G93A mit der Substitution von Glycin zu Alanin an Position 93 des humanen *SOD1*-Gens mit Expression von 20 bis 30 Genkopien in Studien verwendet (Andersen 2006). Die G93A-transgenen Mäuse entwickeln bereits im Alter von drei bis vier Monaten eine der humanen ALS ähnliche Motoneuronerkrankung mit fortschreitender Lähmung der Extremitäten und sterben im Alter von fünf bis sechs Monaten an deren Folgen. Im Vergleich zu Mäusen, die die Wildtyp-Form der humanen SOD exprimieren, ist bei den transgenen Mäusen, bedingt durch eine verminderte Stabilität der mutierten SOD1, nur etwa halb so viel SOD1 nachweisbar, wobei die enzymatische Aktivität der SOD1 jedoch unbeeinflusst bleibt (Gurney et al. 1994). In der Gewebeanalyse zeigten sich schon vor dem Auftreten erster motorischer Symptome vakuoläre Veränderungen in den Motoneuronen des Rückenmarks und des Hirnstamms. Im Endstadium der Erkrankung waren kaum noch vakuoläre Veränderungen, dafür aber ein erheblicher Verlust an Motoneuronen mit einer entsprechenden Reduktion myelinisierter Axone zu sehen. Daneben wurden in einigen verbliebenen Motoneuronen hyaline Inklusionen und eine milde Beteiligung der Hinter- und Seitenstränge des Rückenmarks beobachtet. Im Gegensatz zu den vakuolären Veränderungen, die bei der humanen ALS bisher nicht beschrieben wurden, sind die hyalinen Inklusionen und die Beteiligung der Hinter- und Seitenstränge des Rückenmarks vor allem Merkmale der familiären ALS (Chiu et al. 1995, Dal Canto and Gurney 1994, Dal Canto and Gurney 1995).

G93A-transgene Mäuse mit einer niedrigeren Expressionsrate der humanen SOD1 wiesen einen späteren Krankheitsbeginn sowie einen längeren Krankheitsverlauf von bis zu einem Jahr auf. Bei deren Gewebeanalyse zeigten sich wie bei der humanen

ALS keine vakuolären Veränderungen. Dieses Mausmodell kommt allerdings aufgrund des längeren Krankheitsverlaufs der Mäuse und dem damit verbundenen höheren Zeit- und Kostenaufwand in der experimentellen Forschung selten zum Einsatz (Gurney 1997).

Seit der Etablierung des *hSOD1*-Mausmodells der ALS wurden mehr als 100 verschiedene Substanzen, deren therapeutische Wirksamkeit in *hSOD1*-transgenen Mäusen nachgewiesen werden konnte, in klinischen Studien überprüft. Ein Beispiel dafür ist die antioxidative Substanz Vitamin E, für die eine Verzögerung des Krankheitsbeginns sowie des Krankheitsverlaufs im Mausmodell belegt werden konnte (Gurney et al. 1996). Der positive Einfluss von Vitamin E auf Beginn und Verlauf der ALS bestätigte sich auch in klinischen Studien (Desnuelle et al. 2001), es wurde jedoch weder im Mausmodell noch in klinischen Studien eine Verlängerung der Überlebenszeit beobachtet. Eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit sowohl im Mausmodell als auch in klinischen Studien bewirkte nur der Glutamatantagonist Riluzol (Bensimon et al. 1994, Lacomblez et al. 1996). Auch wenn der Überlebensvorteil für ALS-Patienten lediglich wenige Monate beträgt, bleibt festzuhalten, dass Riluzol bis jetzt die einzige Substanz ist, durch die der Erkrankungsverlauf der ALS therapeutisch beeinflusst werden kann. Daher ist es angezeigt, weitere Studien mit Substanzen durchzuführen, die vermutete pathogenetische Aspekte der ALS aufgreifen, um die ALS in Zukunft kausal behandeln und damit heilen zu können.

1.2.2 Proteinaggregationshemmung

Ein gemeinsames pathologisches Merkmal verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer-, Parkinson- und Prionerkrankungen ist eine gesteigerte intrazelluläre Proteinaggregation, wobei die Proteinkomponente der Aggregate jeweils krankheitsspezifisch ist (Soto and Estrada 2008). Auch die ALS ist durch eine gesteigerte intrazelluläre Proteinaggregation gekennzeichnet. Sowohl bei den familiären, SOD1-assoziierten als auch bei den familiären, SOD1-unabhängigen und sporadischen Formen der ALS sind intrazelluläre Proteinaggregate nachweisbar (Watanabe et al. 2001). Obwohl sich die SOD1-assoziierte Form von den SOD1-unabhängigen Formen der ALS hinsichtlich der Proteinkomponente der Aggregate unterscheidet, scheinen die Pathomechanismen beider Formen ähnlich zu sein (Mackenzie et al. 2007). Daher ist es naheliegend, die therapeutische Wirksamkeit

von Substanzen, die die Proteinaggregation hemmen, zu untersuchen und damit eventuell auch aufzuklären, ob die Proteinaggregate für den Untergang der motorischen Nervenzellen bei der ALS verantwortlich sind.

1.2.2.1 Anle138b

In dieser Studie sollte die Substanz anle138b[11], ein substituiertes Diphenylpyrazol-Derivat (s. Abb. 3), auf ihre therapeutische Wirksamkeit bei der ALS untersucht werden. Anle138b hemmt die Aggregation von Proteinen auf der Stufe der Oligomerisierung und damit die Zusammenlagerung mehrerer identischer Aminosäureketten (Untereinheiten) zu einem Proteinkomplex (Quartärstruktur) (Berg et al. 2012, Voet and Voet 2011).

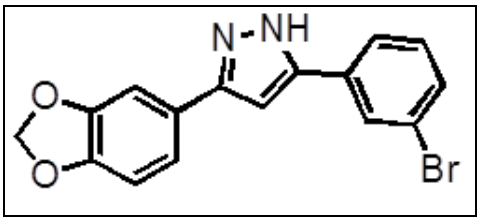


Abbildung 3: Chemische Strukturformel von anle138b
(substituiertes Diphenylpyrazol-Derivat)
(Quelle: Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Griesinger)

Die Substanz anle138b wurde am Max-Planck-Institut (MPI) für biophysikalische Chemie in Göttingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Griesinger, S. Ryazanov und A. Leonov 2009 entwickelt und bereits mehrfach an Mäusen getestet, wobei in therapeutischer Dosierung in Mäusen keine Toxizität auftrat. Außerdem zeigte sich, dass die lipophile Substanz anle138b eine gute orale Bioverfügbarkeit aufweist und die Blut-Hirn-Schranke passiert, wodurch relativ stabile Wirkspiegel im ZNS der Mäuse aufgebaut werden können (Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Griesinger sowie der eigenen Arbeitsgruppe) (s. Abb. 4).

[11] Anle138b ist die Abkürzung für 3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1H-Pyrazol.

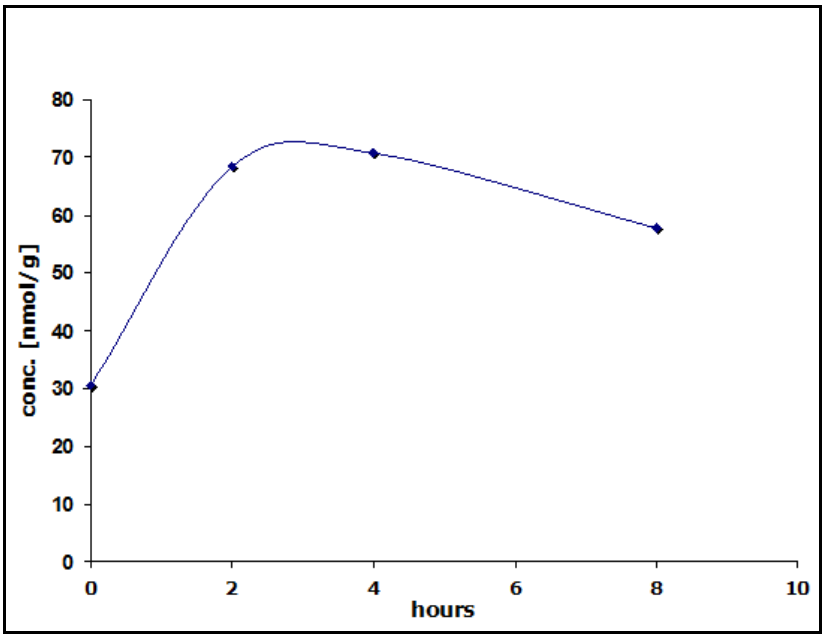


Abbildung 4: ZNS-Wirkspiegel von anle138b nach oraler Verabreichung von Futter (mit 1mg anle138b/g Futter) über drei Tage

(Hochleistungsflüssigkeitschromatographie von Maushirn-Lysaten)

(Quelle: Daten der eigenen Arbeitsgruppe)

In Mausmodellen für die Prion- und die Parkinsonerkrankung wurde durch die Behandlung mit anle138b eine Verzögerung der Krankheitsprogression erreicht. Bei der Prionerkrankung führte die Behandlung mit anle138b zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit. Bei der Parkinsonerkrankung wurde eine Reduktion krankheitsassoziierter Verhaltensdefizite sowie eine Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens beobachtet. In vitro war bei beiden Erkrankungen eine Hemmung der Proteinaggregation durch anle138b nachweisbar. Bei der Parkinsonerkrankung wurde die Bildung von α-Synuclein-Aggregaten und bei der Prionerkrankung die Bildung von Prionproteinaggregaten vermindert. Darüber hinaus wurde bei der Prionerkrankung mit der Aggregationshemmung dem Untergang von Nervenzellen im ZNS entgegengewirkt (Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Griesinger).

1.3 Ziel der Studie

Die vorliegende tierexperimentelle Studie sollte darüber Aufschluss geben, ob durch eine Behandlung *hSOD1*-transgener Mäuse mit einer antiaggregativen Substanz deren Erkrankungsbeginn und -verlauf verzögert und deren Überlebenszeit signifikant verlängert werden kann. Dazu wurde die Wirkung der oral verfügbaren,

antiaggregativen Substanz anle138b auf das Gewicht, die motorischen Fähigkeiten und das Überleben von *hSOD1*-transgenen und Wildtyp-Mäusen untersucht. Außerdem sollte überprüft werden, ob diese Substanz einen Einfluss auf die bei der ALS auftretende Degeneration von Motoneuronen hat und damit eventuell neuroprotektive Eigenschaften aufweist[12].

[12] Diese Fragestellung ist nicht Teil der vorliegenden Arbeit sondern des zweiten Teils der tierexperimentellen Studie, der am Ende des nächsten Kapitels dieser Arbeit kurz dargestellt wird.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Diese Arbeit war als erster Teil einer tierexperimentellen Studie[13] konzipiert. Solche Studien sind momentan noch unerlässlich, da die vorliegenden Forschungsergebnisse über Ursache, Verlauf und Therapie der ALS unbefriedigend sind und daher auf Tiermodelle in der Forschung nicht verzichtet werden kann. Mit dem *hSOD1*-Mausmodell steht in der ALS-Forschung ein etabliertes und bereits in vielen Untersuchungen verwendetes Tiermodell zur Verfügung (Andersen 2006), dass sowohl klinisch als auch neuropathologisch die meisten Aspekte der familiären Form der ALS reflektiert (Chiu et al. 1995, Dal Canto and Gurney 1994, Dal Canto and Gurney 1995, Gurney 1994, Gurney 1997). Vor allem weisen die transgenen Mäuse die charakteristischen Proteinablagerungen auf (Brujin et al. 1997), die nicht nur ein Merkmal der familiären ALS sondern auch der sporadischen ALS sind (Leigh et al. 1991, Shibata et al. 1993). Aus diesen Gründen ist das *hSOD1*-Mausmodell zur Untersuchung der Pathogenese und zur Entwicklung effektiver Therapien der ALS geeignet und kam in dieser Arbeit zum Einsatz.

2.2 Versuchstiere

In die Studie wurden insgesamt 80 weibliche Versuchstiere einbezogen, jeweils 40 *hSOD1*-transgene Mäuse als eigentliche Untersuchungsgruppe und 40 Wildtyp-Mäuse als Kontrollgruppe. Jeweils die Hälfte der transgenen und Wildtyp-Mäuse wurde medikamentös mit der Substanz anle138b behandelt. Daraus ergaben sich insgesamt vier Untersuchungsgruppen mit jeweils 20 Mäusen. Durch die relativ großen Gruppen sollten Schwankungen innerhalb einer Gruppe aufgrund interindividueller Unterschiede zwischen den Mäusen möglichst gering gehalten werden (Crawley 1999, Karl et al. 2003).

Die Mäuse wurden in der tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen gezüchtet, wobei die Hintergrundstämme dem *Jackson Laboratory* in Bar Harbor, Maine, entstammten.

[13] Ein schriftliches Votum des Tierschutzbeauftragten für dieses Forschungsvorhaben liegt vor (Aktenzeichen 33.9-42502-04-10/0097).

Die folgenden beiden Stämme wurden verwendet: B6SJLF1 (Stock Number 100012) und B6SJL-Tg(*SOD1**G93A)1Gur (Stock Number 002726)[14].
Letzterer exprimierte die mutierte Form der humanen SOD1 mit der Substitution von Glycin zu Alanin an Position 93 (G93A). Männliche Mäuse dieses Stammes wurden mit weiblichen Mäusen des anderen Stammes verpaart. Deren Nachkommen wurden in der Abteilung Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Mathias Bähr mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) von aus Schwanzspitzenbiopsien der Mäuse gewonnener DNA genotypisiert. So konnten transgene und Wildtyp-Mäuse identifiziert werden.

2.2.1 Wildtyp-Mäuse

Die Wildtyp-Mäuse exprimierten ausschließlich die murine SOD1 ohne Mutation. Die Gruppe der unbehandelten Wildtyp-Mäuse diente der Generierung eines Nullwerts, auf den die erhaltenen Daten der transgenen Mäuse bezogen werden sollten, um äußere Störungen zu detektieren. Der Vergleich des Gewichts der Gruppe der behandelten Wildtyp-Mäuse mit dem der Gruppe der nicht behandelten Wildtyp-Mäuse diente der Evaluation möglicher anaboler Effekte der Substanz anle138b.

2.2.2 *hSOD1*-transgene Mäuse

Die eigentliche Untersuchungsgruppe bildeten *hSOD1*-transgene Mäuse, bei denen das mutierte humane *SOD1*-Gen nachweisbar war. Die in dieser Studie eingesetzten transgenen Mäuse waren heterozygote Träger der am häufigsten für Forschungszwecke verwendeten G93A-Mutation mit einer hohen Anzahl an Genkopien für eine hohe Expressionsrate der humanen SOD1. Solche Mäuse entwickeln bereits im Alter von drei bis vier Monaten (91±14 Tage) erste motorische Symptome in Form eines zunächst die Hinterläufe betreffenden Tremors, der aufgrund einer Disinhibition spinaler Reflexe und Wallerscher Degeneration[15] in den absteigenden Bahnen des Rückenmarks auftritt. Die Erkrankung führt schließlich zu einer vollständigen Lähmung der Extremitäten und zum Tod der Mäuse im Alter von etwa vier bis fünf Monaten (136±7 Tage) (Chiu et al. 1995, Gurney et al. 1994). Die

[14] Die Nomenklatur der Mausstämme ist auf der Internetseite des Jackson Laboratory (http://jaxmice.jax.org/support/nomenclature/index.html) beschrieben.

[15] Mit dem Begriff Wallersche Degeneration werden die Vorgänge nach der Schädigung eines Nervs im peripheren Nervensystem (PNS) oder von Faserbahnen im zentralen Nervensystem (ZNS) umschrieben, die zum Untergang des distal der Schädigung gelegenen Nerven-/Faserbahnanteils führen.

Gruppe der behandelten transgenen Mäuse wurde mit der Gruppe der nicht-behandelten transgenen Mäuse hinsichtlich ihrer motorischen Fähigkeiten und ihrer Überlebenszeit verglichen, um den Einfluss der Substanz anle138b auf den Krankheitsbeginn und -verlauf der Mäuse zu untersuchen.

2.2.3 Versuchsgruppen

Für die Studie wurden die Mäuse entsprechend ihres Genotyps nach einem durch ein Würfelverfahren gewährleistetes Zufallsprinzip in vier gleich große Gruppen eingeteilt, von denen zwei Gruppen normales Futter (Kontrollfutter) und zwei Gruppen Futter, dem die Substanz anle138b beigemischt war (Spezialfutter), erhielten (s. Tab. 1).

Gruppe	Anzahl	Genotyp	Futter
Gruppe 1	20	*hSOD1*-transgen	Spezialfutter (mit anle138b)
Gruppe 2	20	*hSOD1*-transgen	Kontrollfutter
Gruppe 3	20	Wildtyp	Spezialfutter (mit anle138b)
Gruppe 4	20	Wildtyp	Kontrollfutter

Tabelle 1: Einteilung der Mäuse in vier Versuchsgruppen nach Genotyp und Futter

2.3 Rahmenbedingungen

2.3.1 Versuchszeitraum

Die Versuche wurden aus Kapazitätsgründen in mehreren Blöcken in der Zeit vom 2. August 2010 bis zum 27. Oktober 2011 durchgeführt, wobei eine Beobachtungsgruppe immer vier Mäuse umfasste (je eine behandelte transgene, eine nicht behandelte transgene, eine behandelte Wildtyp- und eine nicht behandelte Wildtyp-Maus) (s. Tab. 1).

2.3.2 Versuchsraum

Die Mäuse wurden in einem fensterlosen, speziell für tierexperimentelle Studien eingerichteten, etwa 10m^2 großen Raum in Einzelkäfigen gehalten (s. Abb. 5).

Abbildung 5: Versuchsraum mit Einzelkäfigen

Die Temperatur in dem klimatisierten Raum betrug 22°C (+/-2°C), die relative Luftfeuchtigkeit 35% (+/-5%). Die Konstanz der Werte wurde durch einen Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsregler gewährleistet (s. Abb. 6).

Abbildung 6: Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsregler im Versuchsraum

Die Lichtsteuerung in diesem Raum erfolgte über eine Zeitschaltuhr, die auf einen zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus eingestellt war. Der Raum wurde in der Zeit von 7 bis 19 Uhr beleuchtet. In der übrigen Zeit herrschte Dunkelheit. Da Mäuse nachtaktive Tiere sind, blieb durch diese Zeitsteuerung deren aktive Phase in der Nacht weitgehend ungestört.

2.3.3 Tierhaltung

Im Versuchsraum befanden sich Einzelkäfige (26cm lang, 20cm breit, 14cm hoch), in die die Mäuse im Alter von etwa 35 Tagen umgesetzt wurden, nachdem sie vorher zusammen in größeren Käfigen gehalten worden waren. In jedem Käfig befanden sich ein Laufrad und ein Häuschen. Der Boden der Käfige war mit dem speziellem Kleintierstreu Lignocel® der Firma *JRS* (J. Rettenmeier & Söhne, Rosenberg) bedeckt. Um eine gleich bleibende Verteilung der Streu zu gewährleisten und eine Blockierung des Laufrads durch Streu zu verhindern, wurde auf den Käfigboden eine Streusperre gelegt, die den Boden in drei Teilflächen unterteilte (s. Abb. 7).

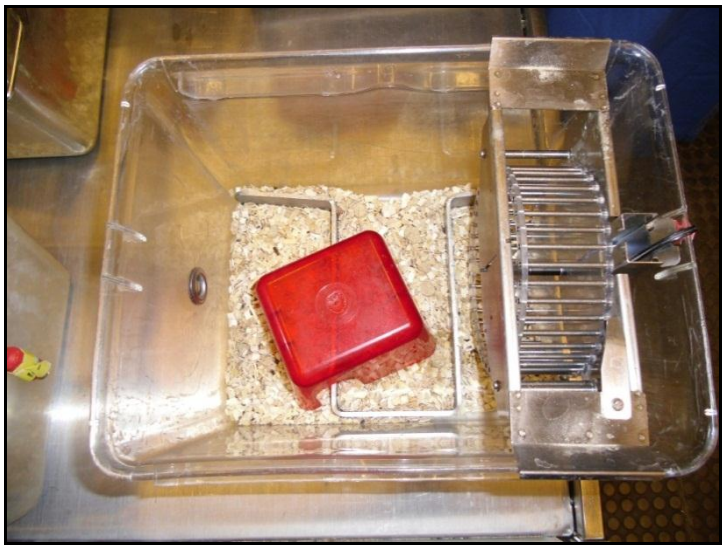


Abbildung 7: Käfig mit Streu, Streusperre, Häuschen und Laufrad mit Sensor

Die Käfige wurden wöchentlich gereinigt. Anschließend wurde die Streu vollständig erneuert. Durch Vorrichtungen zur Futter- und Wasserversorgung in den Käfigen standen den Mäusen das pelletierte Futter sowie Leitungswasser zur freien Verfügung (s. Abb. 8). Da die transgenen Mäuse im Endstadium der Erkrankung nicht mehr in der Lage waren, nach Futter und Wasser zu suchen, wurde diesen Futter auf den Käfigboden gelegt und Petrischalen mit Wasser dazu gestellt.

Abbildung 8: Vorrichtung zur Futter- und Wasserversorgung im Käfig

Die Mäuse erhielten ein speziell für diesen Versuch von der Firma *ssniff Spezialdiäten*, Soest, hergestelltes Kleintierfutter, das bedarfsgerecht von Tierpflegern aufgefüllt wurde (s. Tab. 2).

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

Tabelle 2: Zusammensetzung des Tierfutters
(nach Angaben des Futterherstellers ssniff)

Die artgerechte Haltung und die Gesundheit der Mäuse wurden durch die Versuchsleitung, Tierpfleger und einen Tierarzt täglich überwacht.

2.4 Versuche

Mit dem Umsetzen der Mäuse in die Einzelkäfige im Alter von etwa 35 Tagen begann die orale Gabe der Substanz anle138b. Diese war in das Futter der behandelten Mäuse (Gruppe 1 und 3) gemischt (Spezialfutter) und wurde mit diesem von den Mäusen aufgenommen. In vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde eine durchschnittliche Futteraufnahme von 5g/Tag pro Maus ermittelt. Der Zusatz von

1mg anle138b/g Futter sollte folglich zu einer Aufnahme von 5mg anle138b/Tag pro Maus und damit zu stabilen Wirkspiegeln im ZNS führen (Daten der eigenen Arbeitsgruppe).

Zur gleichen Zeit startete die Aufzeichnung der Laufleistung der Mäuse. Um die bei Erkrankungsausbruch beginnende und im weiteren Verlauf progrediente Muskelatrophie, die damit verbundene Gewichtsabnahme und den Verlust motorischer Fähigkeiten bei den transgenen Mäusen (Gruppe 1 und 2) festzustellen, wurden mit diesen sowie den Wildtyp-Mäusen (Gruppe 3 und 4) folgende Versuche durchgeführt:

1. kontinuierliche Detektion der Laufleistung durch automatisierte Leistungserfassung (Laufrad-Versuch)
2. wöchentliche Gewichtsmessung
3. wöchentliche Detektion der Griffkraft mithilfe eines Grip-Strength-Meters (Grip-Strength-Versuch)
4. wöchentliche Detektion der koordinatorischen und motorischen Fähigkeiten mithilfe eines Rotarod (Rotarod-Versuch)

2.4.1 Laufleistung (Laufrad-Versuch)

Mäuse, die Zugang zu Laufrädern erhalten, lernen schnell darin zu laufen und können dann Strecken von bis zu 10km pro Tag zurücklegen, wobei interindividuell größere Schwankungen möglich sind. Die Erfassung der Laufleistung der Mäuse stellt einen sensitiven Parameter für deren motorische Fähigkeiten und damit auch für deren Krankheitsbeginn und -verlauf dar (Gurney 1997). Die Aufzeichnung der Laufleistung erfolgte rund um die Uhr und umfasste folgende Parameter:

- Anzahl der Läufe pro Woche
- wöchentlich zurückgelegte Gesamtdistanz
- wöchentlich erreichte Maximalgeschwindigkeit
- Gesamtlaufzeit pro Woche.

Die wöchentlich zurückgelegte Gesamtdistanz und die dabei erreichte Maximalgeschwindigkeit waren die entscheidenden Parameter, da eine signifikante Abnahme dieser Parameter noch vor dem Auftreten von klinischen Zeichen wie Muskelatrophien oder Paresen den Beginn bzw. das Fortschreiten der Erkrankung anzeigen kann.

2.4.1.1 Testgerät Laufrad

Jeder Käfig war mit einem Laufrad (Durchmesser 11,3cm, Umfang 35,5cm) ausgestattet, welches in der Abteilung Klinische Neurophysiologie der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Walter Paulus entwickelt und gebaut worden war. Die Laufräder waren mit einer Stoppvorrichtung versehen, die bewirkte, dass sich diese nur in eine Richtung drehen konnten. Außerdem waren diese an einen Sensor angeschlossen, der automatisiert die Laufleistung der Mäuse mit einem speziell für Tierversuche der Universitätsmedizin Göttingen von der Firma *Bönig und Kallenbach*, Dortmund, hergestellten Aufzeichnungsgerät registrierte, solange sich diese in den Einzelkäfigen befanden[16] (s. Abb. 9).

Abbildung 9: Laufrad im Käfig

2.4.2 Gewicht

Durch die versuchsbegleitende Gewichtsmessung sollte der Gewichtsverlust der transgenen Mäuse bedingt durch die mit fortschreitender Erkrankung einhergehende Muskelatrophie überwacht werden. Außerdem diente die Bestimmung des Gewichts der behandelten und nicht behandelten Wildtyp-Mäuse der Evaluation möglicher anaboler Effekte von anle138b.

Zusammen mit den beiden Versuchen wurde das Gewicht der Mäuse in Gramm (g) einmal wöchentlich zu einem definierten Zeitpunkt mithilfe einer Schulwaage (Modell

[16] Die Distanzen wurden in counts gemessen, wobei ein count 2,22cm entsprach und der Sensor 16 counts pro Umdrehung registrierte. Die Zeiten wurden in Zeiteinheiten gemessen, wobei eine Zeiteinheit 0,48s entsprach. Die Geschwindigkeiten wurden in counts pro Zeiteinheit gemessen.

Kern EMB 220-1, Ablesbarkeit 0,1g, maximaler Messbereich 220g) der Firma *Kern & Sohn*, Balingen-Frommern, bestimmt (s. Abb. 10). Das Gewicht der transgenen Mäuse wurde ab dem Zeitpunkt der ersten messbaren Gewichtsabnahme täglich kontrolliert, um den Krankheitsverlauf und damit auch das Auftreten eines der Endpunktkriterien besser beobachten zu können.

Abbildung 10: Schulwaage
für die Gewichtsmessung der Mäuse
(Quelle: Kern & Sohn GmbH, Webdesign Heindl Internet AG)

2.4.3 Griffkraft (Grip-Strength-Versuch)

Die Griffkraft (Grip-Strength) war im Rahmen dieser Studie definiert als die maximale Kraft, die eine Maus mit ihren Vorderpfoten aufwenden kann, um sich an einer Haltevorrichtung festzuhalten, bis eine gleichzeitig einwirkende Gegenkraft ein Loslassen bedingt. Dafür wurde ein natürlicher Greifreflex von Mäusen ausgenutzt, durch welchen sich diese reflexartig mit den Vorderpfoten an einer Haltevorrichtung festhielten, wenn sie, an ihren Schwanzwurzeln hochgehoben, nahe genug vor diese gehalten wurden. Anschließend wurde in zur Haltevorrichtung entgegengesetzter, horizontaler Richtung vorsichtig an den Schwänzen der Mäuse gezogen und auf diese Weise eine Gegenkraft zu der Griffkraft der Mäuse erzeugt. Mit einem an die Haltevorrichtung gekoppelten Kraftsensor konnte die Griffkraft der Mäuse bis zum Zeitpunkt des Loslassens gemessen werden. Jede Maus wurde dreimal getestet, wobei die maximal erreichte Griffkraft für die Versuchsauswertung erfasst wurde. Der Grip-Strength-Versuch wurde einmal wöchentlich zu einem definierten Zeitpunkt zusammen mit dem Rotarod-Versuch und der Gewichtsmessung durchgeführt.

2.4.3.1 Testgerät Grip-Strength-Meter

Die Griffkraft in den Vorderpfoten der Mäuse wurde im Grip-Strength-Versuch ermittelt (Meyer et al. 1979, Smith et al. 1995), der bereits in zahlreichen Studien Anwendung fand (Braunstein 2008, Canton et al. 1998, Canton et al. 2001, Hagemann 2006, Smittkamp et al. 2008). Hierzu wurde ein speziell für Mäuse entwickeltes Kraftmessgerät, das Grip-Strength-Meter der Firma *TSE Systems*, Bad Homburg, eingesetzt[17]. An dem Gerät befindet sich als Haltevorrichtung ein horizontaler Metallbügel, der die auf ihn einwirkende Zugkraft an einen Kraftsensor weiterleitet, welcher wiederum die gemessene Griffkraft in Pond ($9{,}807 \times 10^{-3}$ Newton) anzeigt (s. Abb. 11).

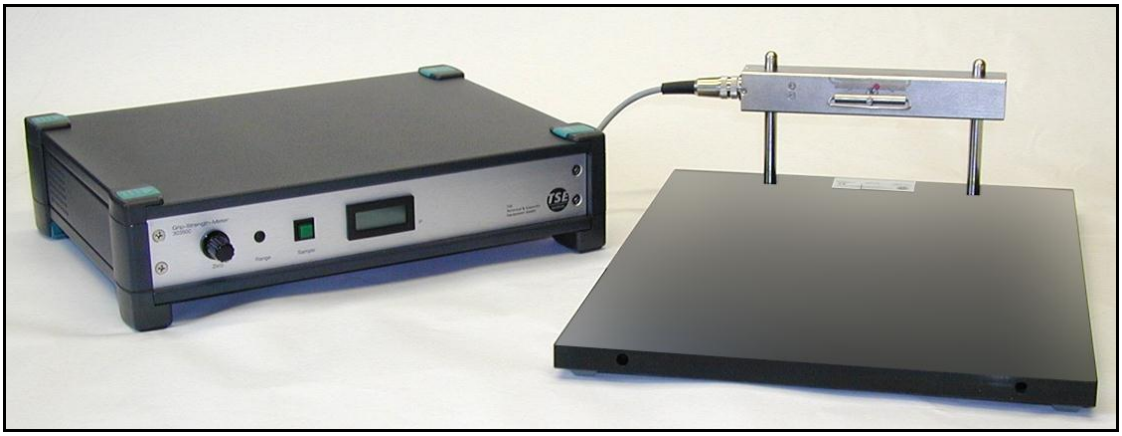


Abbildung 11: Grip-Strength-Meter
für die Bestimmung der Griffkraft in den Vorderpfoten der Mäuse
(Quelle: TSE Systems International Group)

2.4.4 Koordintorische und motorischen Fähigkeiten (Rotarod-Versuch)

Die koordinatorischen und motorischen Fähigkeiten der Mäuse waren im Rahmen dieser Studie definiert als die Fähigkeit sich für eine bestimmte Zeit auf einem rotierenden Rad zu halten. Die vorgegebene Zeit betrug 300s. Für das Erreichen dieser Leistung wurden den Mäusen drei Versuche gewährt. Sobald die Mäuse diese Vorgabe erfüllt hatten, wurde der Versuch beendet. Für die Versuchsauswertung war entscheidend, ob die Mäuse diese Leistung innerhalb der drei Versuche erbringen konnten. Der Rotarod-Versuch wurde einmal wöchentlich zu einem definierten

[17] Nachweise von Institutionen, die das Grip-Strength-Meter zu Forschungszwecken angewendet haben, und Publikationen, in denen die Anwendung beschrieben wird, sind auf der Internetseite der Firma TSE Systems (http://www.tse-systems.com/download/TSE_Grip-Strength-Meter.pdf) zu finden.

Zeitpunkt zusammen mit dem Grip-Strength-Versuch und der Gewichtsmessung durchgeführt.

2.4.4.1 Testgerät Rotarod

Die koordinatorischen und motorischen Fähigkeiten der Mäuse wurden mit dem Rotarod-Versuch ermittelt, der zur Überprüfung von Koordination, Gleichgewicht, Kraft und Ausdauer vorrangig für Mäuse und Ratten entwickelt wurde (Dunham and Miya 1957) und sich seitdem zu einem Standardtest entwickelt hat (Braunstein 2008, Miana-Mena et al. 2005, Smittkamp et al. 2008, Weishaupt et al. 2006, Weydt et al. 2003). Für den Test wurde ein akzelerierendes Rotarod (Typ 7650) von Jones und Roberts der Firma *TSE Sytems*, Bad Homburg, verwendet (Jones and Roberts 1968)[18].

Das Rotarod besteht aus einer rotierenden Walze, die von einem Elektromotor angetrieben wird. Die Walze mit einem Umfang von 11cm ist in einer Höhe von 15cm aufgehängt und verfügt über eine geriffelte Oberfläche, damit die Tiere darauf Halt finden. Die Walze wird durch vier undurchsichtige Plastikscheiben mit jeweils 25cm Durchmesser in fünf Abschnitte mit einer Breite von jeweils 5cm unterteilt, so dass fünf Tiere gleichzeitig auf dieser laufen können ohne Sichtkontakt zueinander zu haben. Unter jedem dieser Abschnitte befindet sich eine Kontaktplatte, die mit einem magnetischen Sensor in Verbindung steht.

Bei dem verwendeten Rotarod konnte zwischen zwei unterschiedlichen Geschwindigkeitsmodi gewählt werden: einem konstanten Geschwindigkeitsmodus und einem Beschleunigungsmodus, bei dem die Geschwindigkeit kontinuierlich bis zum Erreichen einer Maximalgeschwindigkeit zunimmt. Für den Versuch wurde der konstante Geschwindigkeitsmodus gewählt. Die Umdrehungsgeschwindigkeit der Walze betrug dabei 15U/min, was einer Geschwindigkeit von etwa 154cm/min entspricht. Mit Hilfe von Timern wurde die Zeit in Sekunden (s) gemessen, die die einzelnen Mäuse auf dem Rotarod verbrachten. Das Herabfallen einer Maus führte zur Unterbrechung des Kontakts zwischen Kontaktplatte und Sensor und damit zum Stopp des entsprechenden Timers (s. Abb. 12).

[18] Nachweise von Institutionen, die das Rotarod zu Forschungszwecken angewendet haben, und Publikationen, in denen die Anwendung beschrieben wird, sind auf der Internetseite der Firma TSE Systems (http://www.tse-systems.com/download/TSE_RotaRod.pdf) zu finden.

Abbildung 12: Rotarod mit Mäusen

für die Ermittlung von deren koordinatorischen und motorischen Fähigkeiten

(Quelle: TSE Systems International Group)

2.5 Krankheitsbeginn und Überlebenszeit

Im Rahmen der wöchentlichen Durchführung der Versuche wurden die Mäuse auf Symptome der Erkrankung untersucht. Dazu wurden diese an ihren Schwanzwurzeln hochgehoben und in die Luft gehalten, um einen Tremor der Hinterläufe zu festzustellen, der eines der ersten motorischen Symptome der Erkrankung darstellt (Chiu et al. 1995, Gurney et al. 1994, Gurney et al. 1996, Miana-Mena et al. 2005, Weydt et al. 2003).

Anhand der Leistungen der Mäuse im Laufrad-Versuch (signifikante Abnahme der Maximalgeschwindigkeit und der Gesamtdistanz) sowie im Rotarod-Versuch (Zeitpunkt, zu dem die Mäuse die vorgegebene Zeit auf dem Rotarod in drei Versuchen nicht mehr schafften) sollte allerdings noch vor klinisch feststellbaren Zeichen der Beginn der Erkrankung bei den transgenen Mäusen erkennbar sein.

Die Überlebenszeit der Mäuse war gemäß den Regelungen des Tierschutzgesetzes, die Leiden von Versuchstieren möglichst gering zu halten, durch drei verschiedene Endpunktkriterien begrenzt.

2.6 Endpunktkriterien (Versuchsende)

Die Aufzeichnung der Laufleistung und die Versuche wurden dann beendet, wenn die transgenen Mäuse eines der folgenden Endpunktkriterien erfüllten:

- definierter Gewichtsverlust
- definierter Abfall der Laufleistung
- definierter Verlust motorischer Fähigkeiten.

Sowohl die transgenen als auch die zugeordneten Wildtyp-Mäuse wurden beim Auftreten eines dieser Endpunktkriterien bei den transgenen Mäusen getötet. Das Gewebe der Mäuse wurde zum Teil für die Analysen des zweiten Teils der Studie verwendet.

2.6.1 Gewichtsverlust

Ein Gewichtsverlust der transgenen Mäuse von mehr als 10% innerhalb einer Woche war, wie in einer ähnlichen Studie von Weydt et al., in der ein Gewichtsverlust von mehr als 20% als Endpunktkriterium galt (Weydt et al. 2003), als ein Endpunktkriterium definiert.

2.6.2 Abfall der Laufleistung

Als Parameter für den Verlust der motorischen Fähigkeiten der transgenen Mäuse diente deren Laufleistung, wobei eine Abnahme der Laufleistung auf 10% der individuell erreichten Maximalleistung als ein weiteres Endpunktkriterium galt (Gurney 1997).

2.6.3 Verlust motorischer Fähigkeiten

Wenn die transgenen Mäuse nicht mehr in der Lage waren, sich innerhalb von 10s aus einer durch die Versuchsleitung hervorgerufenen Seitenlage zurück in die Ausgangsposition auf vier Pfoten zu drehen, war das Endstadium der Erkrankung erreicht (s. Abb. 13). In diesem Erkrankungsstadium waren die Mäuse motorisch so stark beeinträchtigt, dass sie nicht mehr auf die Suche nach Futter oder Wasser gehen konnten (Gurney 1997). Wie in vergleichbaren Studien von Gurney et al. wurde der Verlust motorischer Fähigkeiten auch in der vorliegenden Studie als ein Endpunktkriterium verwendet (Gurney et al. 1996, Gurney et al. 1998).

Abbildung 13: *hSOD1*-transgene Maus in Seitenlage

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 ein Endpunktkriterium definiert.

2.7 Statistische Methoden

Zur Auswertung der Versuchs- und Laufdaten wurden die Statistiksoftware Statistica Version 10 für statistische und grafische Analysen der Firma *StatSoft* in Tulsa, Oklahoma sowie die Statistiksoftware SAS Version 9.2 für statistische Analysen der Firma *SAS Institute* in Cary, North Carolina, eingesetzt. Die Durchführung der Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Abteilung Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen unter Leitung von Prof. Dr. Tim Friede (namentlich Simon Schneider).

Die Versuchs- und Laufdaten wurden mittels Boxplots und Mittelwertplots mit Standardabweichungen dargestellt. Ein Teil der Versuchs- bzw. Laufdaten war normalverteilt (Gewicht und Grip-Strength). Die Einflussfaktoren Wochenverlauf und Gruppenzugehörigkeit und deren Wechselwirkung wurden mittels zweifaktorieller ANOVA für Messwiederholungen getestet. Gruppenunterschiede an einzelnen Zeitpunkten, die von Interesse waren, wurden mithilfe einer einfaktoriellen ANOVA überprüft. Ein Teil der Daten war nicht normalverteilt (Rotarod, Anzahl der Läufe, Gesamtdistanz, Maximalgeschwindigkeit, Gesamtzeit). Die Einflussfaktoren Wochenverlauf und Gruppenzugerhörigkeit und deren Wechselwirkung wurden ebenfalls mit einer zweifaktorielle aber diesmal nichtparametrischen Varianzanalyse für Messwiederholungen getestet. Gruppenunterschiede an einzelnen Zeitpunkten wurden mithilfe einer einfaktoriellen nichtparametrischen Varianzanalyse überprüft.

Das Signifikanzniveau wurde für alle statistischen Tests auf $\alpha=0{,}05$ festgelegt. Das bedeutet, dass ein p-Wert<0,05 auf eine statistische Signifikanz hindeutet. Für alle

Paarvergleiche wurde eine Bonferroni-Adjustierung durchgeführt und als p* angegeben.
Der Erkrankungsbeginn sowie die Überlebenszeit der transgenen Mäuse wurden mittels Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und mithilfe eines Log-Rank Tests auf statistische Signifikanz überprüft.

2.8 Weiterführende Forschung

Der zweite Teil der tierexperimentellen Studie beinhaltete die Fragestellung, inwieweit die Hemmung der SOD1-Aggregatbildung die Degeneration der Motoneurone bei den transgenen Mäusen beeinflusst. Dazu sollten die Aggregatbildung in den Motoneuronen quantifiziert und die apoptotischen Motoneurone ausgezählt werden. Außerdem sollte untersucht werden, inwiefern die Hemmung der Aggregatbildung die SOD1-Expression beeinflusst (Kleinknecht, in Vorbereitung).

3 Ergebnisse

3.1 Daten

In die Auswertung wurden die Versuchs- (Laufrad-, Grip-Strength- und Rotarod-Versuch sowie Gewichtsmessung) und die Überlebenszeitdaten entsprechend dem Studiendesign einbezogen. Aufgrund von technischen Problemen (zwischenzeitliche Ausfälle des Aufzeichnungsgeräts, der Waage und des Rotarod) kam es allerdings zu einem geringen Datenverlust. Da es sich dabei nur um wenige Aufzeichnungs- bzw. Versuchstage handelte, wurden die Ergebnisse dadurch nicht beeinflusst.

Abgesehen davon wurden folgende Daten aus der Auswertung genommen:

1) die letzten beiden Wochen des Untersuchungszeitraums (16. und 17. Woche), weil die Anzahl der noch lebenden Mäuse in diesen beiden Wochen so gering war (zwölf bzw. vier Mäuse), dass eine statistische Auswertung der Versuchs- und Laufdaten dieses Zeitraums nicht angezeigt war. Damit umfasste der Untersuchungszeitraum statt 17 Wochen nur 15 Wochen.
2) eine nicht behandelte transgene Maus (Gruppe 2) und die zugehörige Wildtyp-Maus (Gruppe 4), weil die transgene Maus im Alter von fünf Monaten noch keinerlei Symptomatik entwickelt hatte. Bei dieser transgenen Maus könnte es zu einem Verlust an Genkopien und damit zu einer niedrigeren Expressionsrate der humanen SOD1 gekommen sein. Dadurch wäre ein späterer Krankheitsbeginn und längerer Krankheitsverlauf zu erklären (Scott et al. 2008). G93A-transgene Mäuse, die eine geringere Anzahl an Genkopien mit einer folglich niedrigeren Expressionsrate der humanen SOD1 aufweisen, zeigen einen ähnlich späten Krankheitsbeginn und langen Krankheitsverlauf mit einer Überlebenszeit von bis zu einem Jahr (Gurney 1997, Shibata 2001). Diese sind mit G93A-transgenen Mäusen, die eine hohe Anzahl an Genkopien mit einer hohen Expressionsrate der humanen SOD1 aufweisen, nicht vergleichbar. Damit wurden anstelle von 80 Mäusen nur 78 Mäuse in die Studie einbezogen (39 transgene sowie 39 Wildtyp-Mäuse, von denen jeweils 20 behandelt und 19 nicht behandelt wurden).

3.2 Auswertung

Das Ziel dieser Studie war, zu eruieren, ob durch die medikamentöse Behandlung von *hSOD1*-transgenen Mäusen deren Erkrankungsbeginn und -verlauf verzögert bzw. deren Überlebenszeit signifikant verlängert werden kann. Dazu wurde die Wir-

kung des Proteinaggregationshemmstoffs anle138b auf die motorischen Fähigkeiten, das Gewicht und das Überleben von *hSOD1*-transgenen und Wildtyp-Mäusen untersucht. Zur Beurteilung der motorischen Fähigkeiten der Mäuse wurden die verschiedenen Parameter der Laufleistung (Anzahl der Läufe, Gesamtdistanz, Maximalgeschwindigkeit, Gesamtzeit), die Griffkraft sowie die koordinatorischen und motorischen Fähigkeiten auf dem Rotarod herangezogen und folgendermaßen ausgewertet:

a) Die einzelnen Parameter der Laufleistung, das Gewicht, die Griffkraft sowie die koordinatorischen und motorischen Fähigkeiten der verschiedenen Gruppen wurden graphisch dargestellt. Anhand von Boxplots sollte gezeigt werden, in welchem Bereich die Daten der Gruppen lagen und wie groß deren Streuung war[19]. Mithilfe von Mittelwertplots mit Standardabweichungen sollten die zeitlichen Verläufe der Daten der Gruppen sowie deren Streuung veranschaulicht werden[20].

b) Die Daten der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) sollten im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten miteinander verglichen und auf statistische Signifikanz überprüft werden:

- Der erste Zeitpunkt betraf die 4. Woche, in der die transgenen Mäuse noch nicht erkrankt waren,
- der zweite die 11. Woche, in der die transgenen Mäuse im Mittel erkrankten,
- der letzte die 14. Woche, in der sich die transgenen Mäuse mehrheitlich im Endstadium der Erkrankung befanden.

c) Der Vergleich des Gewichts der behandelten Wildtyp-Mäuse (Gruppe 3) mit dem der nicht behandelten Wildtyp-Mäuse (Gruppe 4) sollte zeigen, ob anle138b anabole Effekte aufweist.

Darüber hinaus sollten der Erkrankungsbeginn und die Überlebenszeit der transgenen Mäuse anhand von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt, ebenfalls miteinander verglichen und auf statistische Signifikanz überprüft werden.

Falls nicht anders erwähnt, besteht der Hauptfaktor Gruppe in den folgenden Analysen aus den Faktorstufen Gruppe 1 und Gruppe 2. Es konnte keine Wechselwirkung zwischen den Gruppen und der Woche (alle p-Werte > 0,1) jedoch ein Wocheneffekt

[19] Für den Parameter Maximalgeschwindigkeit der Laufleistung, das Gewicht und den Rotarod-Versuch wurden keine Boxplots erstellt.

[20] Die Mittelwertplots für die Parameter Gesamtdistanz, Maximalgeschwindigkeit und Gesamtlaufzeit wurden logarithmisch aufgetragen. 1E6 bedeutet dabei $1x10^6$.

gezeigt werden (alle p-Werte<0,05). Da es vorrangig auf den Unterschied zwischen den Gruppen 1 und 2 ankam, wird der Gruppeneffekt zwischen diesen beiden Gruppen untersucht und der p-Wert angegeben.

3.2.1 Laufleistung (Laufrad-Versuch)

Die kontinuierliche Aufzeichnung der Laufleistung der Mäuse umfasste die Parameter:

- Anzahl der Läufe pro Woche
- wöchentlich zurückgelegte Gesamtdistanz
- wöchentlich erreichte Maximalgeschwindigkeit
- Gesamtlaufzeit pro Woche.

Die wöchentlich zurückgelegte Gesamtdistanz und die dabei erreichte Maximalgeschwindigkeit waren die entscheidenden Parameter für die motorischen Fähigkeiten der Mäuse. Die Anzahl der Läufe und die Gesamtlaufzeit pro Woche waren dagegen eher Parameter für die Aktivität der Mäuse.

3.2.1.1 Anzahl der Läufe

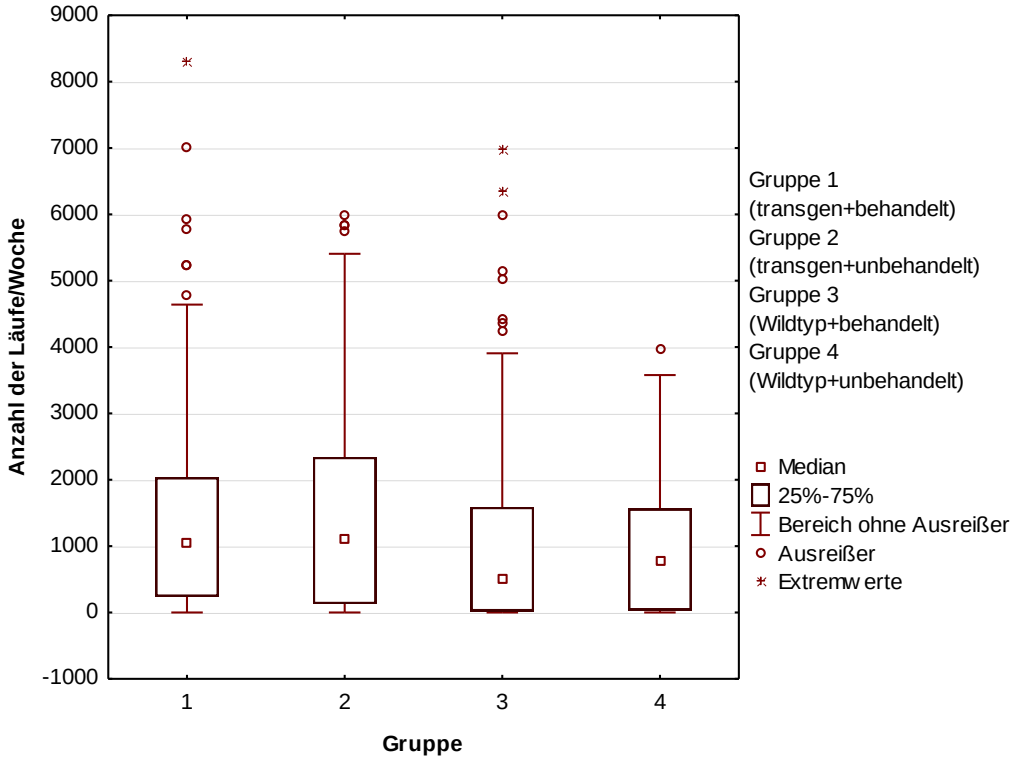


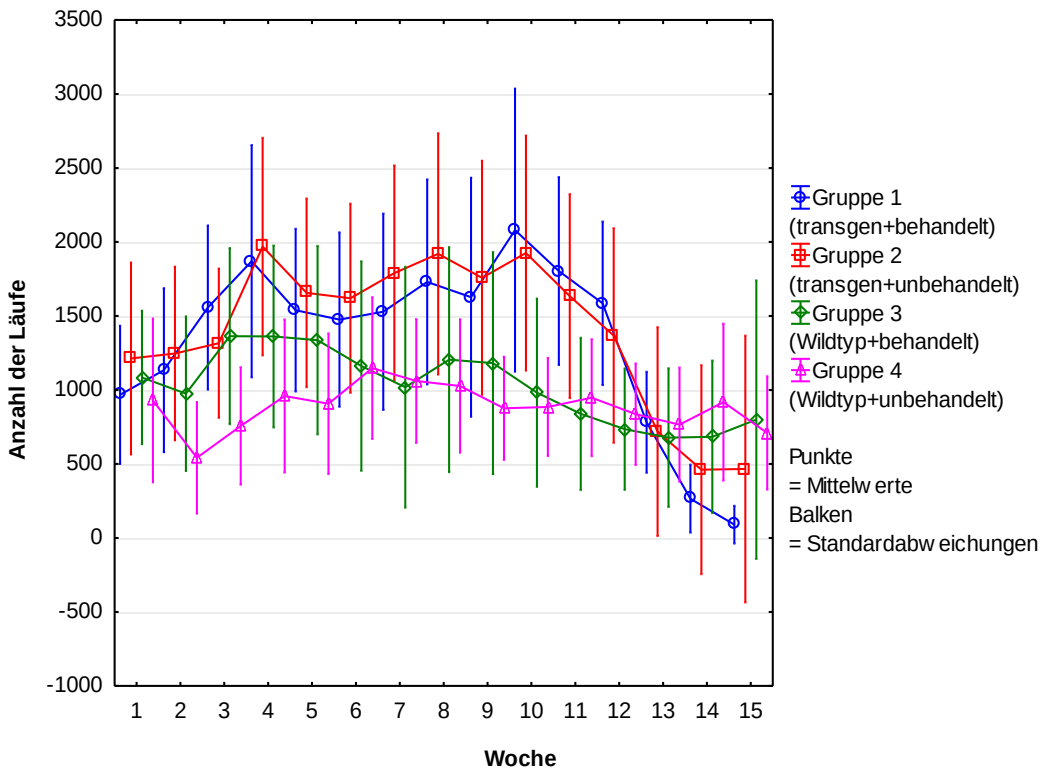
Abbildung 14: Boxplot der Anzahl der Läufe pro Woche der Gruppen im gesamten Untersuchungszeitraum

Die mittlere Anzahl der Läufe pro Woche der behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 1) lag in einem ähnlichen Bereich wie die der nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2) und war höher als die der Wildtyp-Mäuse (Gruppe 3 und 4).

Die Anzahl der Läufe der Gruppe 1 (behandelte transgene Mäuse) lag im Mittel bei 1052 (241-2035)[21] Läufen pro Woche und damit in einem ähnlichen Bereich wie die mittlere Anzahl der Läufe der Gruppe 2 (nicht behandelte transgene Mäuse) mit 1121 (131-2342) Läufen pro Woche. Die mittlere Anzahl der Läufe der Gruppen 3 und 4 war niedriger und lag bei Gruppe 3 (behandelte Wildtyp-Mäuse) bei 499 (22-1588) Läufen pro Woche und bei Gruppe 4 (nicht behandelte Wildtyp-Mäuse) bei 767 (37-1562) Läufen pro Woche.

Die mittlere Anzahl der Läufe pro Woche der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) wies eine größere Streuung auf als die der Gruppen 3 und 4 (Wildtyp-Mäuse) (s. Abb. 14).

[21] Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die beiden Quartile von 25 bzw. 75%.



<u>Abbildung 15</u>: Mittelwertplot mit Standardabweichungen der Anzahl der Läufe der Gruppen im Wochenverlauf

Sowohl die Anzahl der Läufe der behandelten (Gruppe 1) als auch die der nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2) nahm ab der 10. Woche ab.

Die Anzahl der Läufe der Gruppen 3 und 4 (Wildtyp-Mäuse) war im gesamten Untersuchungszeitraum weitgehend stabil. Die Anzahl der Läufe der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) war in den ersten Wochen ansteigend, blieb dann für einige Wochen auf einem gleichbleibendem Niveau über dem der Gruppen 3 und 4. Ab der 10. Woche fiel die Anzahl der Läufe der Gruppen 1 und 2 jedoch wieder unter das Niveau der Gruppen 3 und 4 ab. Der Abfall der Anzahl der Läufe der Gruppe 1 (behandelte transgene Mäuse) setzte sich bis zur letzten Woche fort, während die Anzahl der Läufe der Gruppe 2 (nicht behandelte transgene Mäuse) in den letzten beiden Wochen stagnierte (s. Abb. 15).

Die mittlere Anzahl der Läufe der Gruppe 1 unterschied sich weder im Verlauf noch zu den ausgewählten Zeitpunkten signifikant von der der Gruppe 2 (s. Tab. 3).

	Verlauf	4. Woche	11. Woche	14. Woche
Gruppe 1 mit 2 (transgen+behandelt mit transgen+unbehandelt)	p = 0,8792 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant

Tabelle 3: Vergleich der mittleren Anzahl der Läufe der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten[22]

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der mittleren Anzahl der Läufe der behandelten (Gruppe 1) und der nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2).

3.2.1.2 Gesamtdistanz

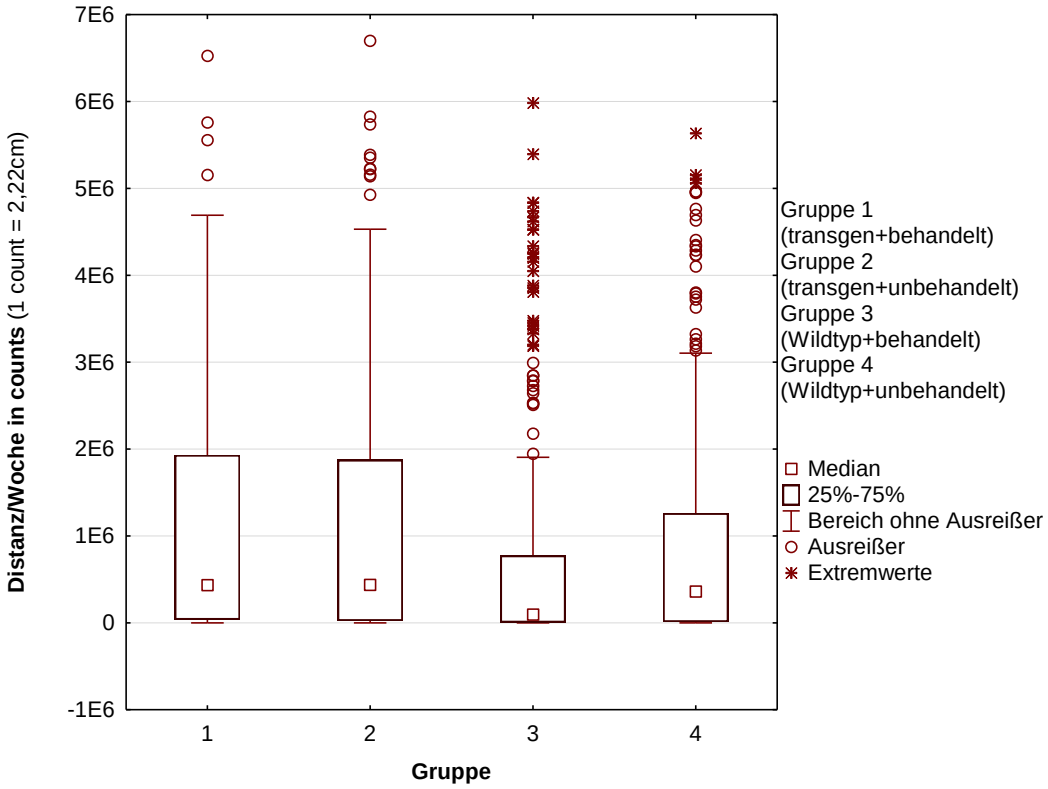


Abbildung 16: Boxplot der Gesamtdistanzen pro Woche der Gruppen im gesamten Untersuchungszeitraum

Die mittleren Gesamtdistanzen pro Woche der behandelten (Gruppe 1) und nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2) unterschieden sich kaum voneinander und waren größer als die der Wildtyp-Mäuse (Gruppe 3 und 4).

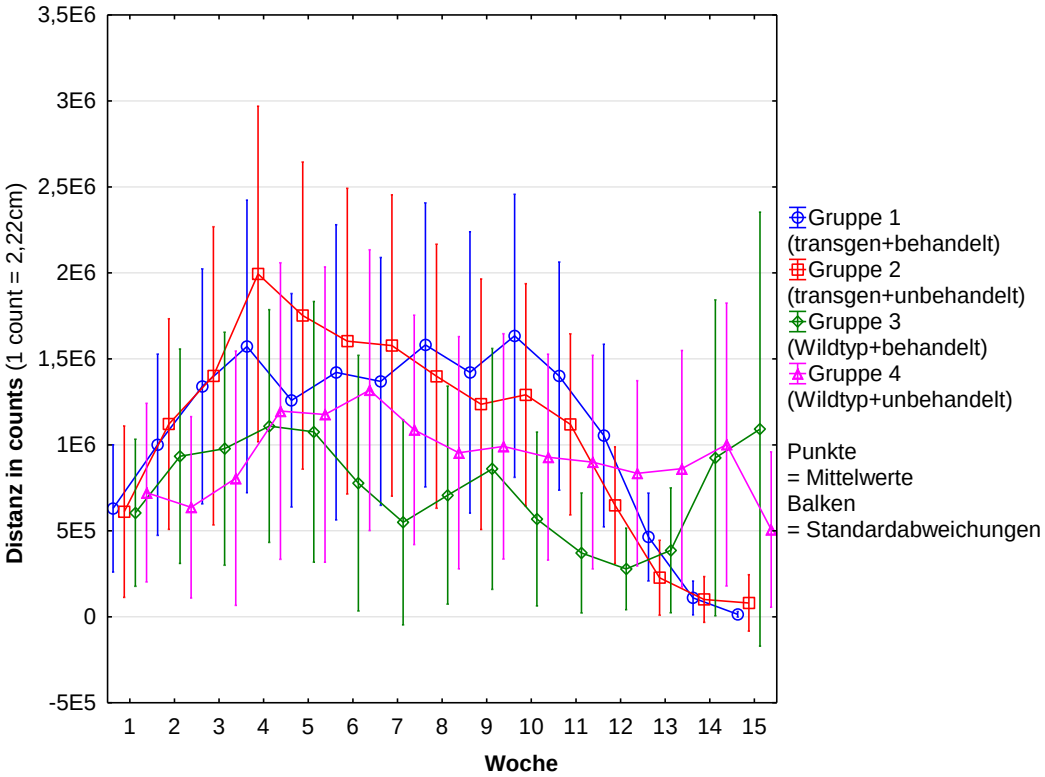
Die pro Woche zurückgelegte Gesamtdistanz der Gruppe 1 (behandelte transgene Mäuse) betrug im Mittel 9,6km (300m-19km)[23] und unterschied sich damit kaum von

[22] p* sind die p-Werte nach Bonferroni-Adjustierung.

[23] Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die beiden Quartile von 25 bzw. 75%.

der der Gruppe 2 (nicht behandelte transgene Mäuse), die 9,7km (239m-18km) betrug, aber war höher als die der Gruppe 3 (behandelte Wildtyp-Mäuse) mit 964m (6m-7,7km) und die der Gruppe 4 (nicht behandelte Wildtyp-Mäuse) mit 3,6km (118m-12km).

Die mittleren pro Woche zurückgelegten Distanzen der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) waren breiter gestreut als die der Gruppen 3 und 4 (Wildtyp-Mäuse), die demgegenüber viele Ausreißer und Extremwerte[24] aufwiesen (s. Abb. 16).



<u>Abbildung 17</u>: Mittelwertplot mit Standardabweichungen der Gesamtdistanzen der Gruppen im Wochenverlauf

Die mittleren Gesamtdistanzen der behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 1) wurden, wie die mittleren Distanzen der nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2), ab der 10. Woche immer kürzer.

In den ersten Wochen des Untersuchungszeitraums zeigte sich ein Anstieg der wöchentlich zurückgelegten Gesamtdistanzen aller Gruppen, wobei der Anstieg der Distanzen der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) steiler war als der der Distanzen der

[24] Ausreißer sind Werte, die zwischen 1,5 und drei Boxenlängen vom oberen Quartil nach oben bzw. vom unteren Quartil nach unten abweichen. Extremwerte liegen außerhalb dieses Bereichs der dreifachen Boxenlänge.

Gruppen 3 und 4 (Wildtyp-Mäuse). Danach blieben die Distanzen aller Gruppen für mehrere Wochen weitgehend stabil, wobei die Gruppen 1 und 2 größere Distanzen als die Gruppen 3 und 4 zurücklegten. Von der 10. bis zur letzten Woche kam es jedoch bei den Distanzen der Gruppen 1 und 2 im Gegensatz zu den Distanzen der Gruppen 3 und 4 zu einem Abfall (s. Abb. 17).

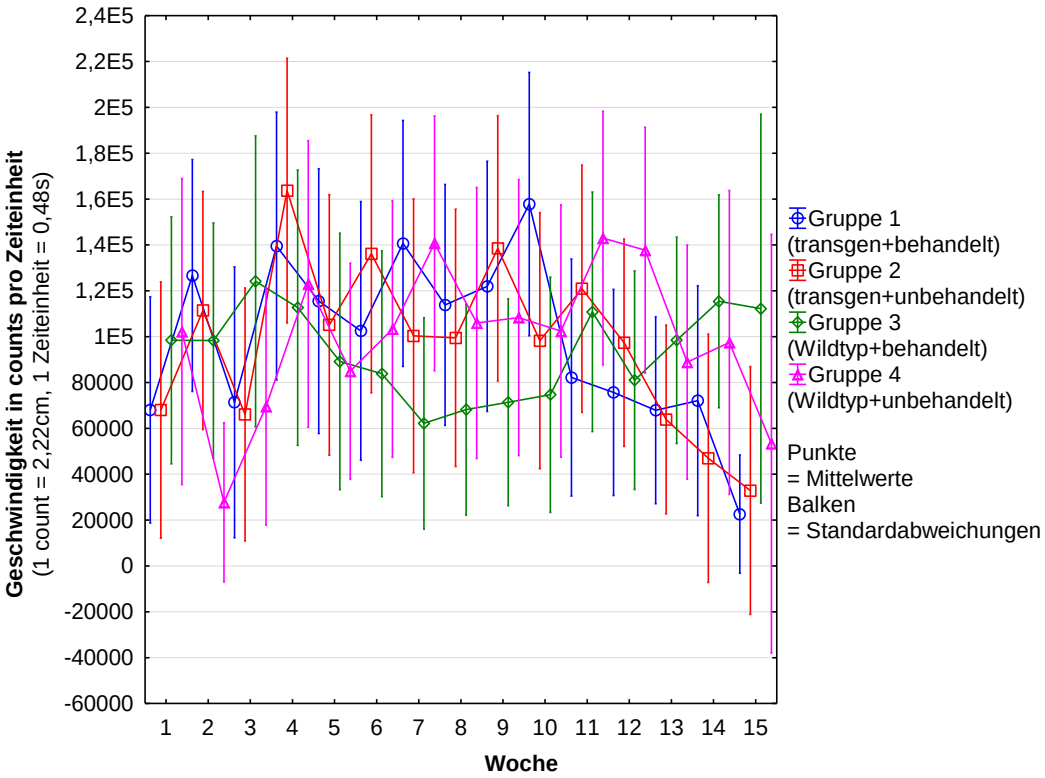
Es bestanden im Verlauf und zu den ausgewählten Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 1 und 2 (behandelte und nicht behandelte transgene Mäuse) (s. Tab. 4).

	Verlauf	**4. Woche**	**11. Woche**	**14. Woche**
Gruppe 1 mit 2 (transgen+behandelt mit transgen+unbehandelt)	p = 0,9859 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant

Tabelle 4: Vergleich der mittleren Gesamtdistanzen der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren Distanzen der behandelten (Gruppe 1) und der nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2).

3.2.1.3 Maximalgeschwindigkeit



<u>Abbildung 18</u>: Mittelwertplot mit Standardabweichungen der Maximalgeschwindigkeiten der Gruppen im Wochenverlauf

Die mittlere Maximalgeschwindigkeit der behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 1) fiel ab der 10., die der nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2) ab der 11. Woche ab.

Die wöchentlich erreichten Maximalgeschwindigkeiten der verschiedenen Gruppen schwankten in den ersten Wochen des Untersuchungszeitraums sehr stark. Erst ab der 10. bzw. 11. Woche zeichnete sich ein Abfall der Maximalgeschwindigkeiten der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) ab. Die Maximalgeschwindigkeiten der Gruppen 3 und 4 (Wildtyp-Mäuse) schwankten dagegen weiterhin (s. Abb. 18).

Es waren weder im Wochenverlauf noch zu den ausgewählten Zeitpunkten signifikante Unterschiede zwischen den mittleren Maximalgeschwindigkeiten der Gruppen 1 und 2 (behandelte und nicht behandelte transgene Mäuse) nachweisbar (s. Tab. 5).

	Verlauf	4. Woche	11. Woche	14. Woche
Gruppe 1 mit 2 (transgen+behandelt mit transgen+unbehandelt)	p = 0,7976 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant	p* = 0,8319 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant

Tabelle 5: Vergleich der mittleren Maximalgeschwindigkeiten der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren Maximalgeschwindigkeiten der behandelten (Gruppe 1) und nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2).

3.2.1.4 Gesamtlaufzeit

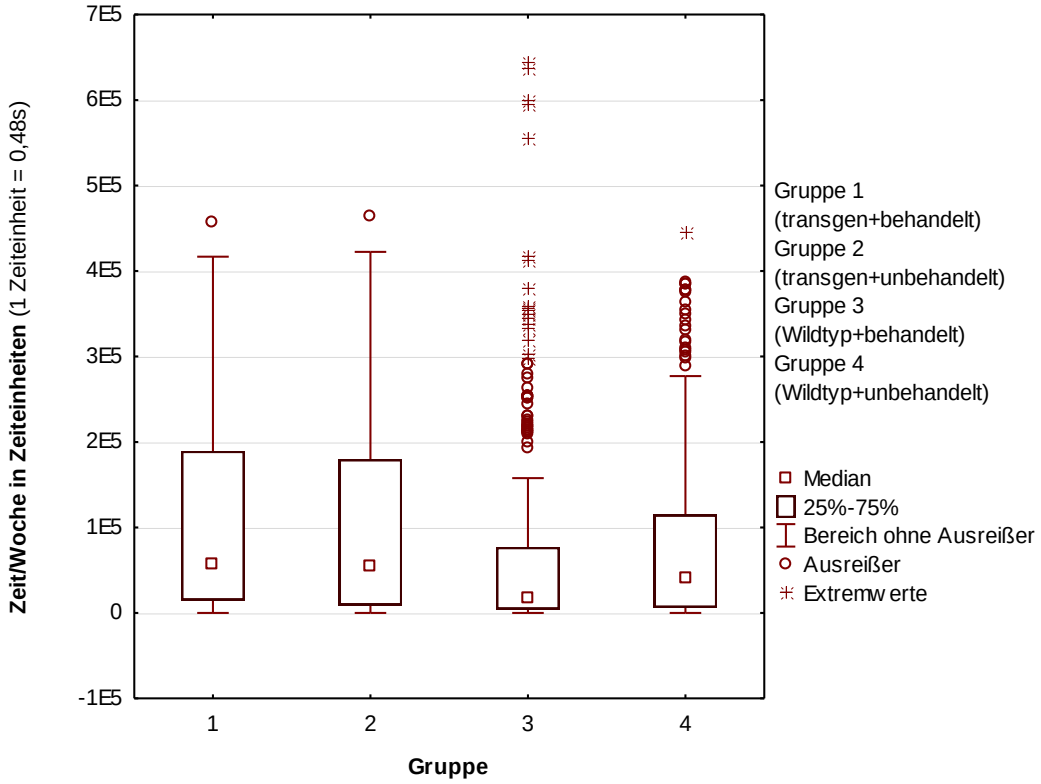


Abbildung 19: Boxplot der Gesamtlaufzeiten pro Woche der Gruppen im gesamten Untersuchungszeitraum

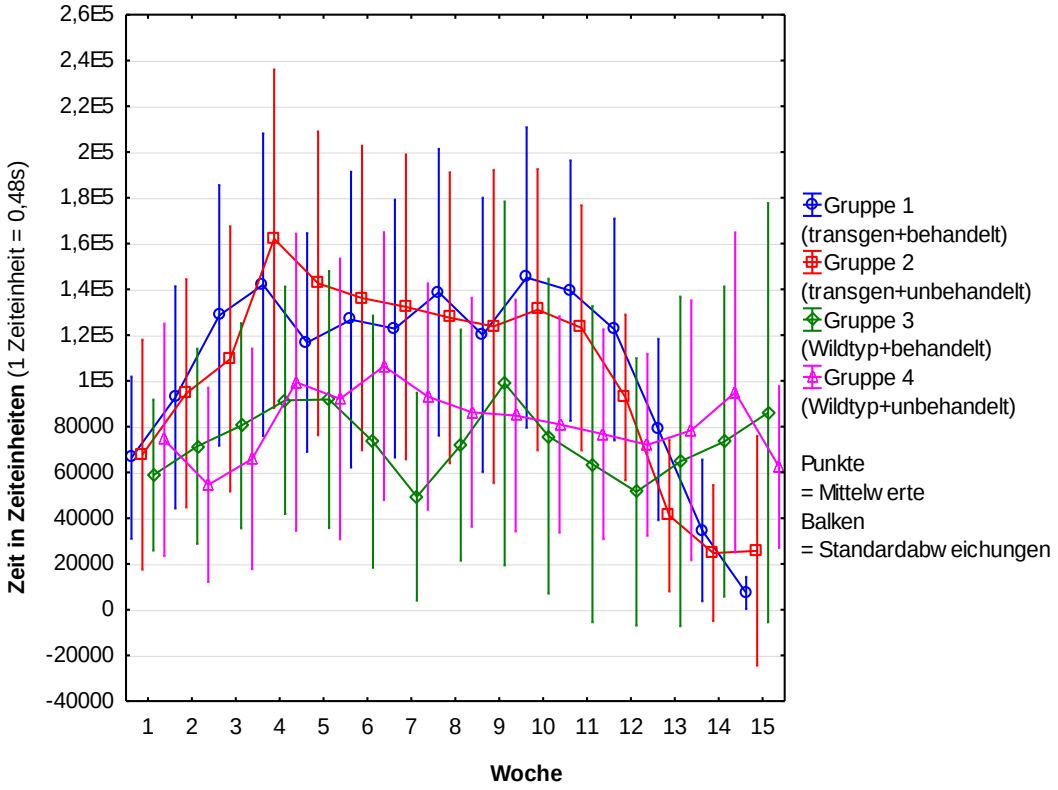
Die mittleren Gesamtlaufzeiten pro Woche der behandelten (Gruppe 1) und nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2) unterschieden sich kaum voneinander und waren länger als die der Wildtyp-Mäuse (Gruppe 3 und 4).

Die Gesamtlaufzeit der Gruppe 1 (behandelte transgene Mäuse) belief sich im Mittel auf 7,5h (2-25h)[25] pro Woche und unterschied sich damit kaum von der der Gruppe 2 (nicht behandelte transgene Mäuse) mit 7,4h (1,2-24h) pro Woche. Die mittlere

[25] Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die beiden Quartile von 25 bzw. 75%.

Gesamtlaufzeit der Gruppe 3 (behandelte Wildtyp-Mäuse) war mit 2,3h (0,6-10h) pro Woche genauso wie die der Gruppe 4 (nicht behandelte Wildtyp-Mäuse) mit 5,3h (0,8-15h) pro Woche kürzer.

Die wöchentlichen Gesamtlaufzeiten der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) wiesen, wie bei der Gesamtdistanz, eine breitere Streuung auf als die der Gruppen 3 und 4 (Wildtyp-Mäuseviele), bei denen wiederum viele Ausreißer und Extremwerte zu verzeichnen waren (s. Abb. 19).



<u>Abbildung 20</u>: Mittelwertplot mit Standardabweichungen der Gesamtlaufzeiten der Gruppen im Wochenverlauf

Sowohl die Gesamtlaufzeiten der behandelten (Gruppe 1) als auch die der nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2) wurden ab der 10. Woche kürzer.

Die Gesamtlaufzeiten der Gruppen 3 und 4 (Wildtyp-Mäuse) waren im gesamten Untersuchungszeitraum weitgehend stabil, die der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) zeigten demgegenüber in den ersten Wochen eine ansteigende Tendenz und blieben dann für mehrere Wochen auf gleichbleibendem Niveau. In den letzten Wochen fielen die Gesamtlaufzeiten der Gruppen 1 und 2 wieder deutlich ab, wobei die Gesamtlaufzeit der Gruppe 2 (nicht behandelte transgene Mäuse) im Gegensatz zu

der der Gruppe 1 (behandelte transgene Mäuse) in den letzten beiden Wochen stagnierte (s. Abb. 20).

Die Gesamtlaufzeiten der Gruppen 1 und 2 (behandelte und nicht behandlete transgene Mäuse) unterschieden sich sowohl im Wochenverlauf als auch zu den ausgewählten Zeitpunkten nicht signifikant voneinander (s. Tab. 6).

	Verlauf	**4. Woche**	**11. Woche**	**14. Woche**
Gruppe 1 mit 2 (transgen+behandelt mit transgen+unbehandelt)	p = 0,9260 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant

Tabelle 6: Vergleich der mittleren Gesamtlaufzeiten der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren Gesamtlaufzeiten der behandelten (Gruppe 1) und nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2).

3.2.2 Gewicht

Das Gewicht aller Mäuse wurde einmal wöchentlich bestimmt. Bei den transgenen Mäusen wurde das Gewicht ab dem Zeitpunkt der ersten messbaren Gewichtsabnahme täglich kontrolliert. Die dabei ermittelten Werte wurden jedoch nicht in die Auswertung aufgenommen sondern dienten nur dazu, den Krankheitsverlauf der transgenen Mäuse und damit das Auftreten eines der Endpunktkriterien zu überwachen.

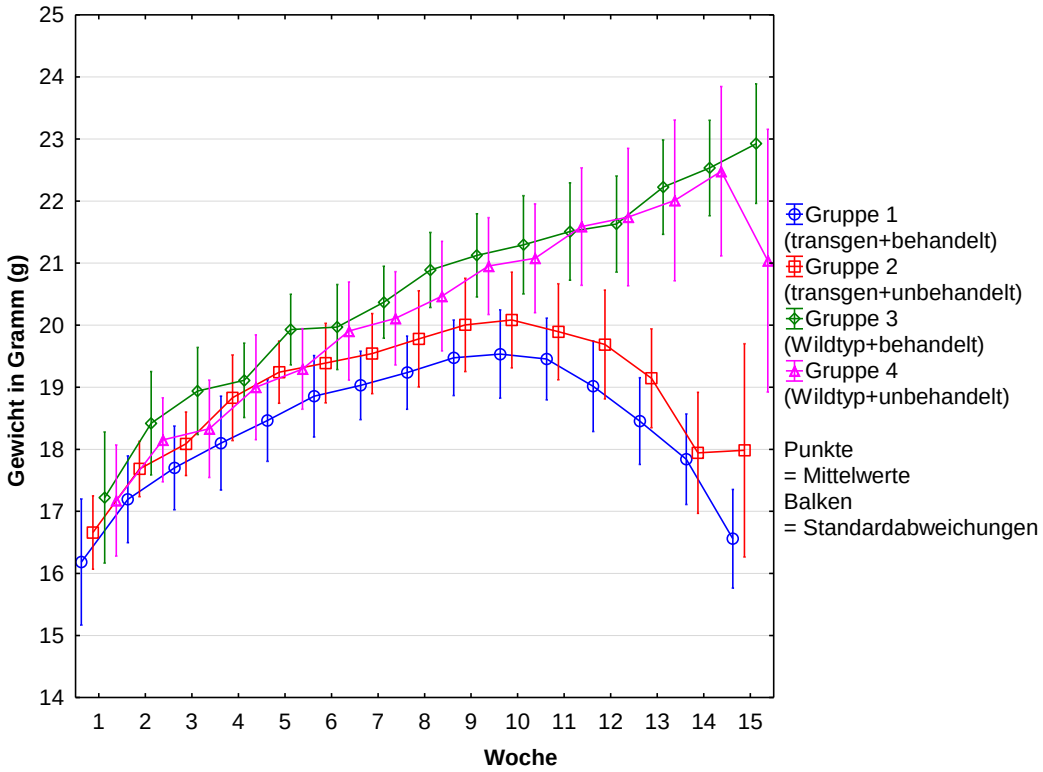


Abbildung 21: Mittelwertplot mit Standardabweichungen des Gewichts der Gruppen im Wochenverlauf

Sowohl die behandelten (Gruppe 1) als auch die nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2) verloren nach anfänglicher Gewichtszunahme ab der 10. Woche wieder deutlich an Gewicht.

Das mittlere Gewicht der Mäuse aller Gruppen bei Aufnahme in den Versuch im Alter von etwa 35 Tagen lag zwischen 16 und 18g. Dabei waren die Gruppen 3 und 4 (Wildtyp-Mäuse) etwas schwerer als die Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse)[26].

[26] 1. Woche: 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 1) = [15,16702g;17,19965g]; 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 2) = [16,06781g;17,24984g]; 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 3) = [16,16462g;18,27982g]; 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 4) = [16,27901g;18,07099g]

In den ersten Wochen des Untersuchungszeitraums nahmen alle Mäuse kontinuierlich an Gewicht zu, wobei das Gewicht der Gruppen 3 und 4 immer über dem der Gruppen 1 und 2 lag. Während die Gruppen 1 und 2 ab der 10. Woche wieder Gewicht verloren, nahmen die Gruppen 3 und 4 weiterhin an Gewicht zu. Das Gewicht der Gruppe 2 (nicht behandelte transgene Mäuse) fiel in den letzten beiden Wochen im Gegensatz zu dem der Gruppe 1 nicht mehr ab. Die Gruppe 3 (behandelte Wildtyp-Mäuse) nahm bis zum Versuchsende zu, während die Gruppe 4 (nicht behandelte Wildtyp-Mäuse) in den letzten beiden Wochen wieder abnahm. Das mittlere Gewicht der Mäuse der Gruppen 1 und 2 lag bei Ausschluss aus dem Versuch im Alter von etwa 140 Tagen zwischen 16 und 18g[27]. Die Mäuse der Gruppen 3 und 4 erreichten ein mittleres Endgewicht zwischen 21 und 23g[28] (s. Abb. 21).

Bei diesem Parameter gibt es neben den Faktorstufen Gruppe 1 und Gruppe 2 die Faktorstufen Gruppe 3 und 4. Auch in diesem Fall konnte keine Wechselwirkung zwischen den Gruppen und der Woche (alle p-Werte < 0,1) jedoch ein Wocheneffekt gezeigt werden (alle p-Werte < 0,05). Da es auch hier vorrangig auf den Unterschied zwischen den Gruppen 1 und 2 bzw. 3 und 4 ankam, wurden die Gruppeneffekte zwischen den jeweiligen Gruppen untersucht und die p-Werte angegeben.

Zwischen Gruppe 1 und 2 (behandelte und nicht behandelte transgene Mäuse) sowie Gruppe 3 und 4 (behandelte und nicht behandelte Wildtyp-Mäuse) bestanden zu keinem Zeitpunkt signifikante Gewichtsunterschiede (s. Tab. 7).

[27] 15. Woche: 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 1)=[15,76454g;17,35202g]; 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 2)=[16,26480g;19,70187g]

[28] 15. Woche: 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 3)=[21,96213g;23,88787g]; 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 4)=[18,92261g; 23,15739g]

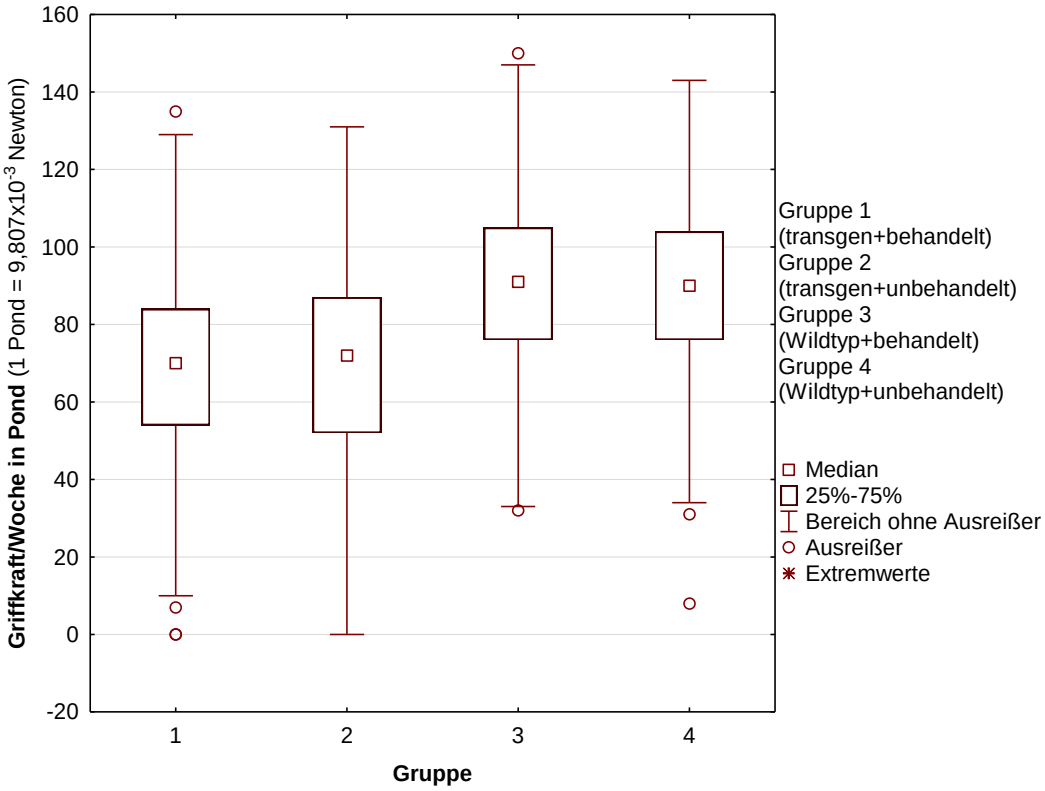
	Verlauf	4. Woche	11. Woche	14. Woche
Gruppe 1 mit 2 (transgen+behandelt mit transgen+unbehandelt)	p = 0,1359 nicht signifikant	p* = 0,3915 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant
Gruppe 3 mit 4 (Wildtyp+behandelt mit Wildtyp+unbehandelt)	p = 0,5148 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant

Tabelle 7: Vergleiche des mittleren Gewichts der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) sowie der Gruppen 3 und 4 (Wildtyp-Mäuse) im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten

Es zeigten sich keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen den behandelten (Gruppe 1) und nicht behandelten transgenen Mäusen (Gruppe 2) sowie den behandelten (Gruppe 3) und nicht behandelten Wildtyp-Mäusen (Gruppe 4).

3.2.3 Griffkraft (Grip-Strength-Versuch)

Die Griffkraft, die die Mäuse mit ihren Vorderpfoten aufbringen konnten, wurde ebenfalls einmal wöchentlich bestimmt. Die Griffkraft jeder Maus wurde dreimal getestet und der Maximalwert wurde in die Auswertung aufgenommen.

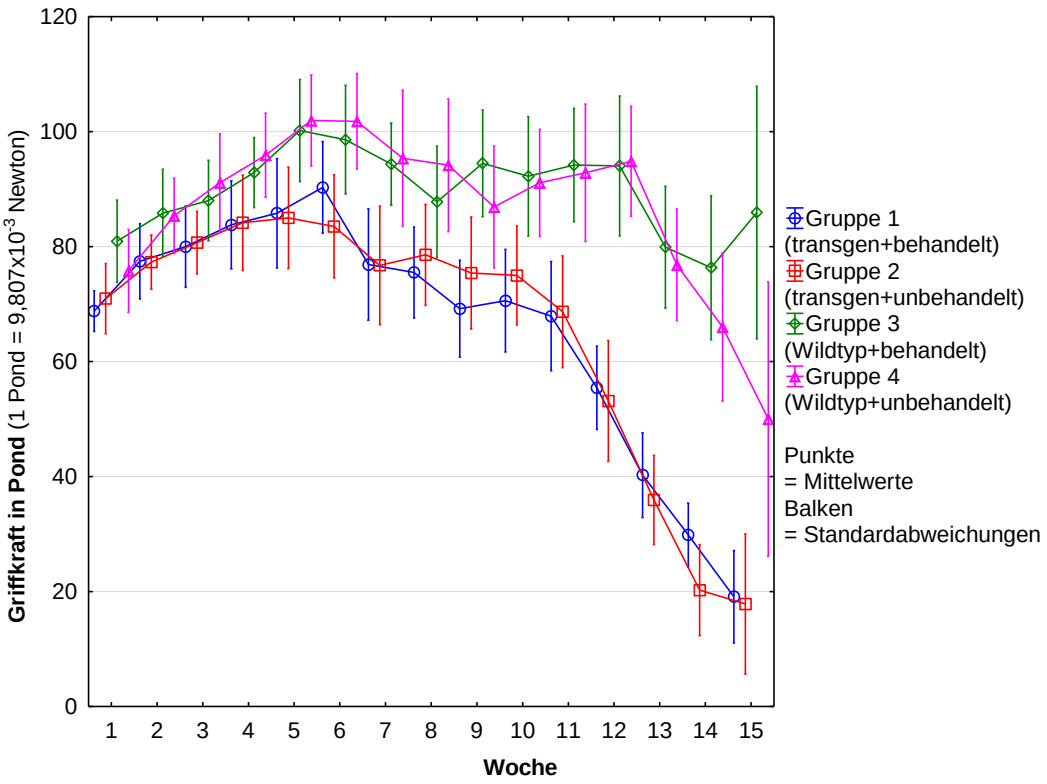


<u>Abbildung 22</u>: Boxplot der wöchentlichen Griffkraft der Gruppen im gesamten Untersuchungszeitraum

Die mittlere Griffkraft der behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 1) unterschied sich kaum von der der nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2), war aber geringer als die der Wildtyp-Mäuse (Gruppe 3 und 4).

Die Gruppe 1 (behandelte transgene Mäuse) erreichte im wöchentlichen Mittel eine Griffkraft um 70 Pond (54-84 Pond)[29] und unterschied sich damit kaum von der Gruppe 2 (nicht behandelte transgene Mäuse) mit einer mittleren Griffkraft um 72 Pond (52-87 Pond), war aber geringer als die der Gruppen 3 und 4 (Wildtyp-Mäuse) Die Gruppe 3 (behandelte Wildtyp-Mäuse) erreichte eine mittlere Griffkraft um 91 Pond (76-105 Pond) und die Gruppe 4 (nicht behandelte Wildtyp-Mäuse) um 90 Pond (76-104 Pond) (s. Abb. 22).

[29] Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die beiden Quartile von 25 bzw. 75%.



<u>Abbildung 23</u>: Mittelwertplot mit Standardabweichungen der Griffkraft der Gruppen im Wochenverlauf

Sowohl die Griffkraft der behandelten (Gruppe 1) als auch die der nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2) nahm ab der 10. Woche ab.

Zu Beginn erreichten die Gruppen eine mittlere Griffkraft zwischen 78 und 81 Pond[30]. In den ersten Wochen des Untersuchungszeitraums stieg die Griffkraft aller Gruppen an, wobei der Anstieg der Griffkraft der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) etwas geringer war als der der Gruppen 3 und 4 (Wildtyp-Mäuse). Alle Gruppen erreichten zwischen der 5. und 6. Woche ihre höchsten Griffkraftwerte. Dabei lag die mittlere Griffkraft der Gruppen zwischen 68 und 102 Pond. Die Griffkraft der Gruppen 3 und 4 fiel danach etwas ab, blieb dann aber mehrere Wochen stabil oberhalb des Niveaus der Griffkraft dieser Gruppen zu Beginn des Untersuchungszeitraums. Die Griffkraft der Gruppen 1 und 2 fiel deutlicher ab und lag dann auf dem Niveau der Griffkraft dieser Gruppen zu Beginn des Untersuchungszeitraums. Ab der 11. Woche kam es zu einem stärkeren Abfall der Griffkraft der Gruppen 1 und 2. Auch die Griffkraft der Gruppen 3 und 4 zeigte ab der 12. Woche eine absteigende Tendenz, die sich bei

[30] 1. Woche: 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 1)=[65,2385;72,3170]; 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 2)=[64,8266;77,0558]; 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 3)=[73,7877;88,1012]; 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 4)=[68,5638;83,0362]

der Gruppe 4 (nicht behandelte Wildtyp-Mäuse), wie bei den Gruppen 1 und 2, im Gegensatz zu der Gruppe 3 (behandelte Wildtyp-Mäuse) bis zum Ende fortsetzte. Zuletzt erreichten die Gruppen 1 und 2 eine mittlere Griffkraft zwischen 17 und 19 Pond und die Gruppen 3 und 4 zwischen 50 und 85 Pond[31] (s. Abb. 23).

Die mittlere Griffkraft der Gruppe 1 (behandelte transgene Mäuse) unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von der der Gruppe 2 (nicht behandelte transgene Mäuse) (s. Tab. 8).

	Verlauf	**4. Woche**	**11. Woche**	**14. Woche**
Gruppe 1 mit 2 (transgen+behandelt mit transgen+unbehandelt)	p = 0,8882 nicht signifikant	p*= 1,0000 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant

Tabelle 8: Vergleich der mittleren Griffkraft der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten

Es zeigten sich, abgesehen von der 14. Woche, keine signifikanten Unterschiede zwischen der mittleren Griffkraft der behandelten (Gruppe 1) und nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2).

[31] 15. Woche: 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 1)=[11,0489;27,1177]; 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 2)=[5,6415;30,0252]; 95%-Konfidenzintervall (Gruppe 3)=[63,9261;107,9073]; 95%-Konfidenz-intervall (Gruppe 4)=[26,1323;73,8677]

3.2.4 Koordinatorische und motorische Fähigkeiten (Rotarod-Versuch)

Der Rotarod-Versuch wurde wie der Grip-Strength-Versuch und die Gewichtsmessung einmal wöchentlich durchgeführt, wobei von drei Versuchen, die jede Maus für das Erreichen der vorgegebenen Zeit von 300s auf dem Rotarod erhielt, wie im Grip-Strength-Versuch nur der Maximalwert in die Auswertung aufgenommen wurde.

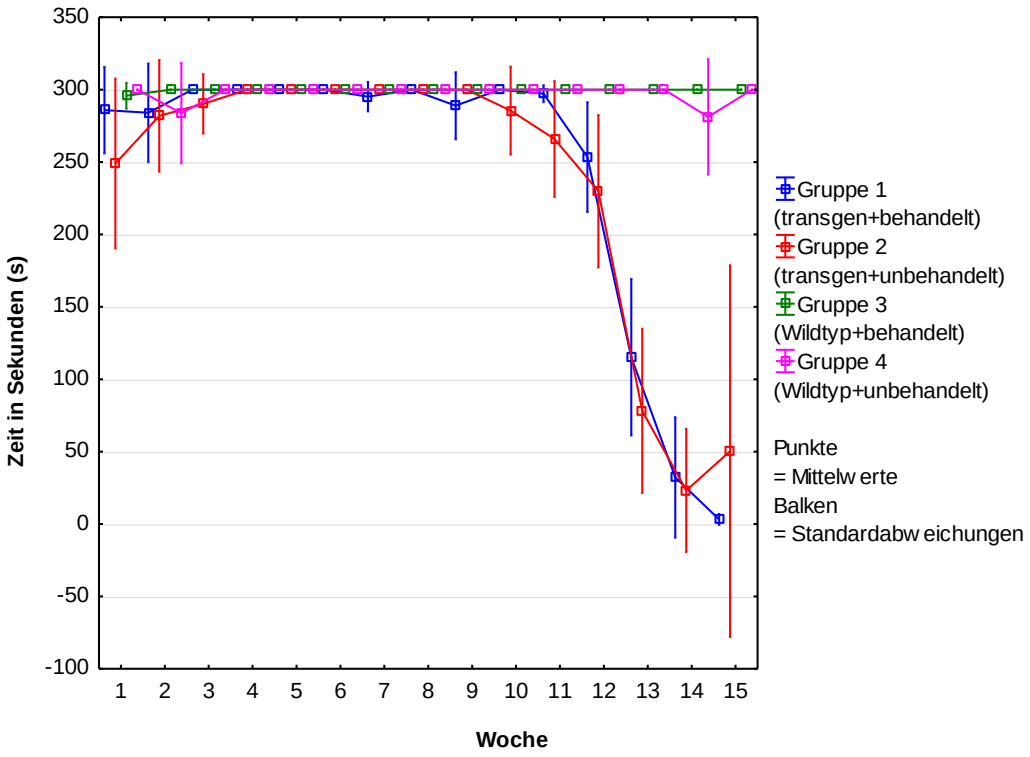


Abbildung 24: Mittelwertplot mit Standardabweichungen der Rotarod-Zeiten der Gruppen im Wochenverlauf

Die behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 1) konnten die Zeitvorgabe von 300s auf dem Rotarod ab der 10. Woche, die nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2) konnten diese ab der 11. Woche nicht mehr bewältigen.

In den ersten Wochen des Untersuchungszeitraums konnten noch nicht alle Mäuse der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) die vorgegebene Zeit von 300s auf dem Rotarod bewältigen. Ab der 3. Woche konnten alle Mäuse der Gruppe 1 (behandelte transgene Mäuse) und ab der 4. Woche alle Mäuse der Gruppe 2 (nicht behandelte transgene Mäuse) die Zeitvorgabe erfüllen. Die Gruppen 3 und 4 (Wildtyp-Mäuse) konnten die Zeitvorgabe abgesehen von der 2. und der 14. Woche, in denen dies nicht allen Mäusen der Gruppe 4 gelang, im gesamten Untersuchungszeitraum erfüllen. Die Gruppe 1 (behandelte transgene Mäuse) konnte die Zeitvorgabe ab der 10. Woche und die Gruppe 2 (nicht behandelte transgene Mäuse) ab der 11. Woche

nicht mehr bewältigen. In der letzten Woche war die Rotarod-Zeit der Gruppe 2 (nicht behandelte transgene Mäuse) wieder ansteigend, während die der Gruppe 1 (behandelte transgene Mäuse) auf 0s abfiel (s. Abb. 24).
Zwischen den mittleren Rotarod-Zeiten der Gruppen 1 und 2 (behandelte und nicht behandelte transgene Mäuse) bestanden weder im Verlauf noch zu den ausgewählten Zeitpunkt signifikante Unterschiede (s. Tab. 9).

	Verlauf	**4. Woche**	**11. Woche**	**14. Woche**
Gruppe 1 mit 2 (transgen+behandelt mit transgen+unbehandelt)	p = 0,3758 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant	p* = 0,2904 nicht signifikant	p* = 1,0000 nicht signifikant

Tabelle 9: Vergleich der mittleren Rotarod-Zeiten der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren Rotarod-Zeiten der behandelten (Gruppe 1) und nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2).

3.2.5 Krankheitsbeginn

Der Krankheitsbeginn der transgenen Mäuse konnte noch vor klinisch sichtbaren Zeichen anhand von deren Leistungen im Rotarod-Versuch festgestellt werden. Dabei war der Zeitpunkt, zu dem die transgenen Mäuse die vorgegebene Zeit von 300s auf dem Rotarod innerhalb von drei Versuchen nicht mehr schafften, als der Zeitpunkt des Beginns der Symptomatik und damit der Erkrankung definiert.

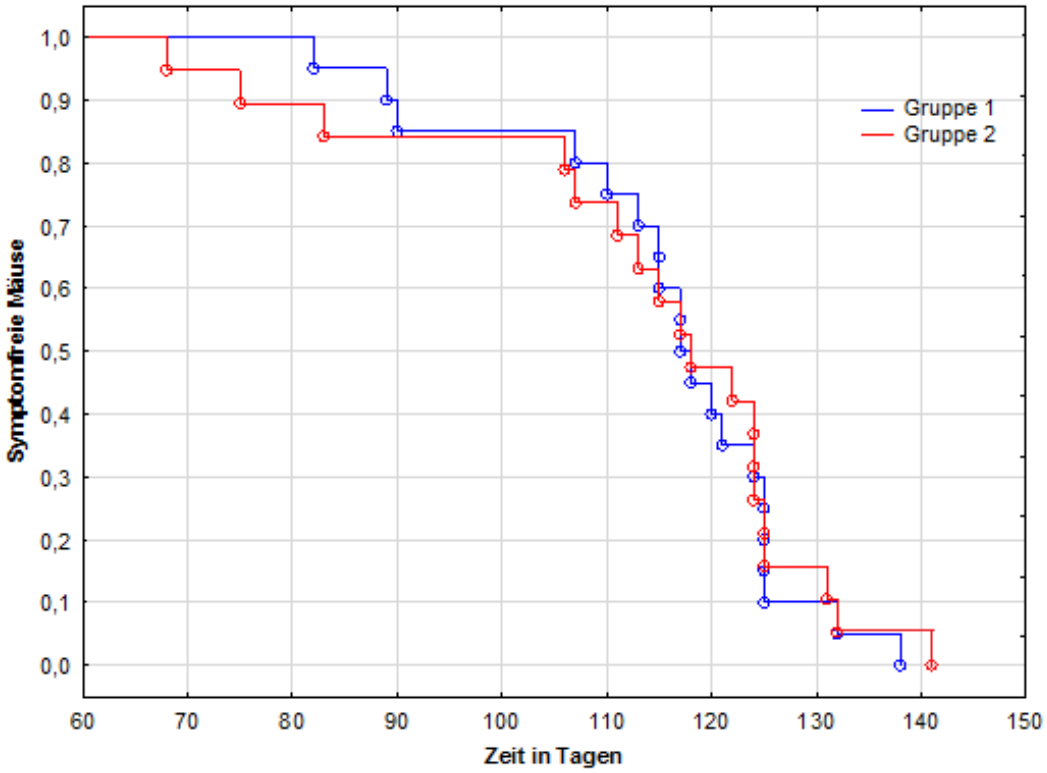


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve für den Beginn der Symptomatik bei den transgenen Mäusen

Der Beginn der Symptomatik und damit der Erkrankung bei den behandelten transgenen Mäusen (Gruppe 1) unterschied sich nicht signifikant von dem der nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2).

Der Beginn der Symptomatik der transgenen Mäuse schwankte zwischen 68 und 141 Tagen. Im Mittel lag dieser bei 114±17 Tagen[32], wobei die Mäuse der Gruppe 1 (behandelte transgene Mäuse) mit 115±14 Tagen etwas später erkrankten als die der Gruppe 2 (nicht behandelte transgene Mäuse) mit 113±19Tagen. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Erkrankungsbeginn der Gruppe 1 und dem der Gruppe 2 bestand jedoch nicht (p=0,85978) (s. Abb. 25).

[32] Die Angaben beziehen sich auf den Mittelwert und die Standardabweichung.

3.2.6 Überlebenszeit

Die Überlebenszeit der transgenen Mäuse war gemäß den Regelungen des Tierschutzgesetzes durch drei verschiedene Endpunktkriterien begrenzt. Von den drei Endpunktkriterien wurde nur der Verlust motorischer Fähigkeiten berücksichtigt.

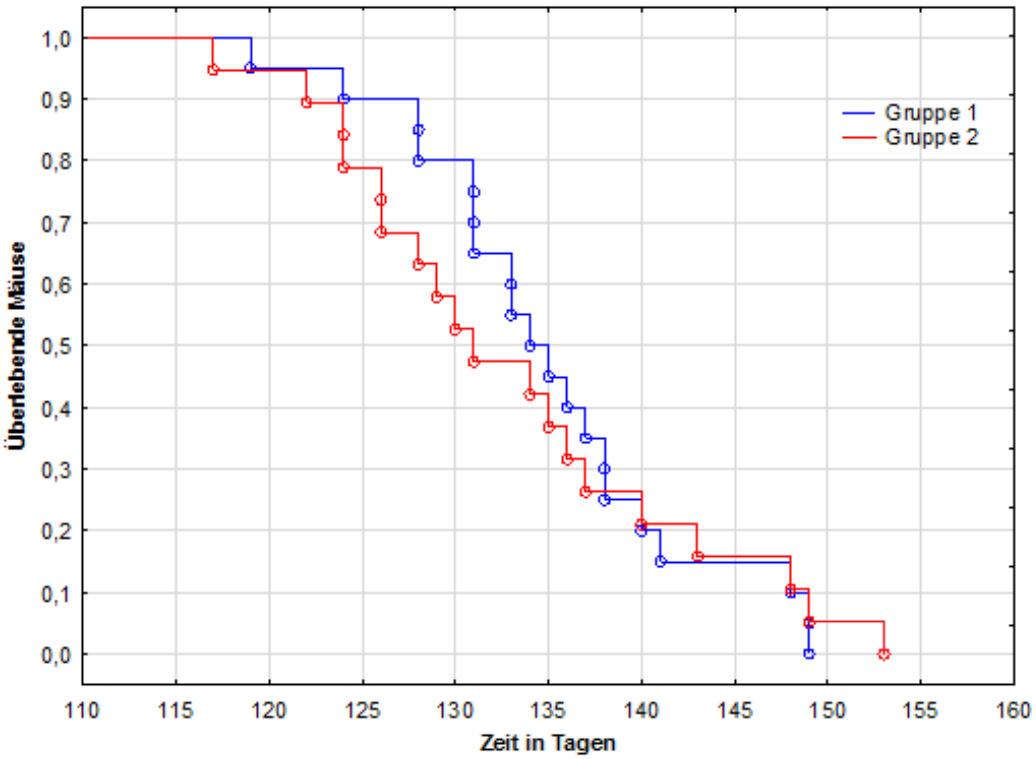


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve für die Überlebenszeit der transgenen Mäuse
Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Überlebenszeit der behandelten (Gruppe 1 mit 134 Tagen) und nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2 mit 135 Tagen) (p=0,76481).

Die Überlebenszeiten der Mäuse schwankten zwischen 117 und 153 Tagen. Im Mittel lag diese bei 134±9Tagen[33], wobei die Mäuse der Gruppe 1 (behandelte transgene Mäuse) mit 135±8 Tagen etwas länger überlebten als die der Gruppe 2 (nicht behandelte transgene Mäuse) mit 133±10 Tagen.
Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Überlebenszeit der beiden Gruppen war allerdings nicht feststellbar (p=0,76481) (s. Abb. 26).

[33] Die Angaben beziehen sich auf den Mittelwert und die Standardabweichung.

4 Diskussion

4.1 Behandlungsergebnis

Das Ziel dieser Studie war mithilfe verschiedener Versuche (Laufrad-, Grip-Strength- und Rotarod-Versuch) zur Überprüfung der motorischen Fähigkeiten von Mäusen zu zeigen, dass *hSOD1*-transgene Mäuse von einer Behandlung mit dem Proteinaggregationshemmstoff anle138b hinsichtlich ihres Erkrankungsbeginns und -verlaufs sowie ihrer Überlebenszeit profitieren. Die Auswertung der Versuche ergab jedoch, dass anle138b weder eine Verzögerung des Erkrankungsbeginns bzw. -verlaufs noch einen Überlebensvorteil für die *hSOD1*-transgenen Mäuse (Gruppe 1) gegenüber den nicht behandelten *hSOD1*-transgenen Mäusen (Gruppe 2) bewirkte.

4.1.1 Motorische Fähigkeiten

Die Leistungen der mit anle138b behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 1) im Laufrad-Versuch und deren Leistungen im Grip-Strength- sowie im Rotarod-Versuch unterschieden sich zu fast keinem Zeitpunkt signifikant von den Leistungen der nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2). Die Leistungen der behandelten transgenen Mäuse im Laufrad-, Grip-Strength- und Rotarod-Versuch nahmen ab der 10. bzw. 11. Woche des Untersuchungszeitraums mit Beginn der Erkrankung im Alter von 114±17 Tagen[34] genauso wie die Leistungen der nicht behandelten transgenen Mäuse kontinuierlich ab. Bei den Wildtyp-Mäusen (Gruppe 3 und 4), die nicht erkrankten, kam es zu keinem Leistungseinbruch. Die Behandlung mit anle138b hatte demnach keinen positiven Einfluss auf die motorischen Fähigkeiten und damit den Krankheitsverlauf der transgenen Mäuse

4.1.1.1 Laufrad-, Grip-Strength- und Rotarod-Versuch

Schlaffe sowie spastische Paresen der Extremitätenmuskulatur sind ein relativ spezifisches Merkmal der ALS (Brooks 1994, Brooks et al. 2000) und gehen mit entsprechenden motorischen Defiziten, wie z.B. Gangschwierigkeiten, einher. Durch die kontinuierliche Erfassung der Laufleistung mithilfe des Laufrad-Versuchs, insbesondere der wöchentlich zurückgelegten Gesamtdistanz und der dabei erreichten Maximalgeschwindigkeit, lässt sich der erkrankungsbedingte Verlust der motorischen Fähigkeiten bei *hSOD1*-transgenen Mäusen daher gut abbilden.

[34] Die Angaben beziehen sich auf den Mittelwert und die Standardabweichung.

Aus diesem Grund stellt der Laufrad-Versuch auch einen geeigneten Test zur Überprüfung des Einflusses neuer Therapien auf die motorischen Fähigkeiten *hSOD1*-transgener Mäuse und damit deren Wirksamkeit bei der ALS dar (Gurney 1997).
In der vorliegenden Studie hatte die Behandlung mit anle138b keine Auswirkung auf die Laufleistung und damit die motorischen Fähigkeiten von *hSOD1*-transgenen Mäusen. In einer vergleichbaren Studie von Gurney et al. aus dem Jahr 1996 wurde die Erfassung der Laufleistung *hSOD1*-transgener Mäuse zur Überprüfung der therapeutischen Wirksamkeit von Vitamin E, Riluzol sowie Gabapentin eingesetzt. Bei den transgenen Mäusen, die mit Vitamin E behandelt wurden, konnte mithilfe des Laufrad-Versuchs eine Verzögerung des Krankheitsbeginns sowie der Krankheitsprogression nachgewiesen werden. Durch die Behandlung mit Riluzol bzw. Gabapentin wurden der Krankheitsbeginn und die Krankheitsprogression bei den transgenen Mäusen nicht beeinflusst, dafür aber deren Überlebenszeit verlängert (Gurney et al. 1996). In einer anderen Studie von Gurney et al. aus dem Jahr 1998 diente die Erfassung der Laufleistung der Untersuchung des Einflusses von Riluzol auf die motorischen Fähigkeiten *hSOD1*-transgener Mäuse im Erkrankungsverlauf, wobei mithilfe des Laufradversuchs eine längere Erhaltung der motorischen Fähigkeiten der transgenen Mäuse durch Riluzol belegt werden konnte (Gurney et al. 1998).
Darüber hinaus wurden die Leistungen der Mäuse im Grip-Strength- sowie im Rotarod-Versuch als Parameter für deren motorische Fähigkeiten herangezogen. Sowohl das Grip-Strength-Meter als auch das Rotarod werden häufig in präklinischen Studien, vor allem bei Ratten und Mäusen, eingesetzt, wobei der Rotarod-Versuch der am weitesten verbreitete und meistakzeptierte Test zur Untersuchung neuer Therapien in der tierexperimentellen Forschung ist (Miana-Mena et al. 2005, Weydt et al. 2003). Hinsichtlich des Rotarod-Versuchs muss jedoch berücksichtigt werden, dass koordinatorische Defizite ein Hinweis auf zerebelläre Läsionen sind, die bei der ALS nicht auftreten, sodass mit dem Rotarod-Versuch im Gegensatz zum Grip-Strength-Versuch nur indirekt motorische Defizite hinsichtlich Kraft und Ausdauer nachgewiesen werden können. Hinzu kommt, dass Mäuse etwas Zeit benötigen, um das Laufen auf dem Rotarod zu erlernen (Weydt et al. 2003). Um niedrige Messwerte zu vermeiden, sollten Mäuse vor der Durchführung des Rotarod-Versuchs im Rahmen einer Studie einem Training unterzogen werden. Um nicht zu hohe Messwerte zu erhalten, ist bei der Wahl des konstanten Geschwindigkeitsmodus des Rotarod eine Zeitvorgabe erforderlich (Jones and Roberts 1968). In der vorliegenden

Studie betrug die Zeitvorgabe bei einer konstanten Geschwindigkeit von 15U/min 300s, allerdings erhielten die Mäuse vor Beginn der Studie kein Training, was erklärt, dass einige Mäuse in den ersten Wochen des Untersuchungszeitraums noch Schwierigkeiten hatten, die Zeitvorgabe zu erreichen. Im Rotarod-Versuch zeigte sich mit Beginn der Erkrankung eine Abnahme der Leistungen sowohl der behandelten (Gruppe 1) als auch der nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2) gegenüber den Wildtyp-Mäusen (Gruppen 3 und 4) aber zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den transgenen Mäusen (Gruppen 1 und 2).

In ähnlichen Studien von Weydt et al. aus dem Jahr 2003 und Miana-Mena et al. aus dem Jahr 2005 nahmen die Leistungen von unbehandelten *hSOD1*-transgenen Mäusen im Rotarod-Versuch verglichen mit denen von Wildtyp-Mäusen im Alter von 105 bzw. 98 Tagen ab[35] (Miana-Mena et al. 2005, Weydt et al. 2003).

Die Leistungen der behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 1) im Grip-Strength-Versuch unterschieden sich wie deren Leistungen im Laufrad- und im Rotarod-Versuch zu keinem Zeitpunkt signifikant von den Leistungen der nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2). Sowohl die Griffkraft der behandelten als auch die der nicht behandelten transgenen Mäuse nahm ab der 5. bzw. 6. Woche des Untersuchungszeitraums ab, fiel aber erst ab der 10. bzw. 11. Woche mit Beginn der Erkrankung deutlich gegenüber der Griffkraft der Wildtyp-Mäuse (Gruppen 3 und 4) ab.

Eine Erklärung dafür, dass die Leistungen der transgenen Mäuse im Grip-Strength-Versuch schon vor dem Beginn der Erkrankung abnahmen und schwächer waren als die Leistungen der Wildtyp-Mäuse, könnte zum einen sein, dass die transgenen Mäuse kleiner und leichter und dementsprechend weniger kräftig als die Wildtyp-Mäuse waren. Zum anderen könnte eine frühzeitige Reduktion der Muskelkraft bei den transgenen Mäusen zu den schwächeren Leistungen geführt haben.

In einer Studie von Canton et al. aus dem Jahr 1998 wird von einer reduzierten Muskelkraft bei unbehandelten *hSOD1*-transgenen Mäusen bereits im Alter von 35 Tagen berichtet. In dieser Studie nahm die Griffkraft der transgenen Mäuse im Verlauf der Erkrankung im Alter von 120 bis 140 Tagen verglichen mit der Griffkraft von Wildtyp-Mäusen signifikant ab. Dieser Abfall setzte sich bis zu deren Tod im Alter von 155 bis 159 Tagen fort (Canton et al. 1998).

[35] In den beiden Studien betrug die Zeitvorgabe 180s bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 15U/min.

Zusammengefasst zeigen nicht nur die Ergebnisse des Laufrad-, Grip-Strength- sowie Rotarod-Versuchs sondern auch die Vergleiche mit den anderen Studien, dass die motorischen Fähigkeiten der transgenen Mäuse durch die Behandlung mit anle138b in keiner Hinsicht beeinflusst werden konnten.

4.1.2 Gewicht

Die Gewichtsverläufe der behandelten (Gruppe 1) und nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2) unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Beide Gruppen verloren mit dem Beginn der Erkrankung im Alter von 114±17 Tagen[36] gleichermaßen an Gewicht, was dafür spricht, dass die mit der Erkrankung einhergehende Muskelatrophie bei den transgenen Mäusen von der Behandlung mit anle138b unbeeinflusst blieb. Verglichen mit den Wildtyp-Mäusen (Gruppen 3 und 4) waren die transgenen Mäuse (Gruppen 1 und 2) schon zu Beginn der Gewichtsmessung im Alter von 35 Tagen leichter.

In der Studie von Miana-Mena et al. aus dem Jahr 1995 wogen unbehandelte *hSOD1*-transgene Mäuse bereits im Alter von 14 Tagen signifikant weniger als Wildtyp-Mäuse und verloren ab einem Alter von 95 Tagen an Gewicht (Miana-Mena et al. 2005). Weydt et al. konnten in der Studie aus dem Jahr 2003 bei unbehandelten *hSOD1*-transgenen Mäusen ab einem Alter von 91 Tagen einen deutlichen Gewichtsverlust nachweisen (Weydt et al. 2003). Die Vergleiche mit diesen beiden Studien deuten ebenfalls darauf hin, dass anle138b keinen Einfluss auf die Muskelatrophie der transgenen Mäuse hatte.

Darüber hinaus ergab der Vergleich der Gewichtsverläufe der behandelten (Gruppe 3) und nicht behandelten Wildtyp-Mäuse (Gruppe 4) keine signifikanten Gewichtsunterschiede, die für einen anabolen Effekt von anle138b sprechen würden.

4.1.3 Krankheitsbeginn und Überlebenszeit

Die Behandlung mit anle138b hatte weder Einfluss auf den Erkrankungsbeginn noch auf die Überlebenszeit der behandelten transgenen Mäuse. Es zeigte sich keine Verzögerung des Symptombeginns und auch keine Verlängerung der Überlebenszeit bei den behandelten transgenen Mäusen (Gruppe 1) verglichen mit den nicht behandelten transgenen Mäusen (Gruppe 2). Die behandelten transgenen Mäuse wurden im Alter von 115±14 Tagen symptomatisch und überlebten 135±8 Tage, während die

[36] Die Angaben beziehen sich auf den Mittelwert und die Standardabweichung.

nicht behandelten transgenen Mäuse im Alter von 113±19 Tagen symptomatisch wurden und 133±10 Tage überlebten.

Die große Variabilität des Krankheitsbeginns zwischen 68 und 141 Tagen und der Überlebenszeiten zwischen 117 und 153 Tagen bei den transgenen Mäusen in der vorliegenden Studie wurde für das G93A-Mausmodell und den Hintergrundstamm B6SJL in einer Studie von Heiman-Patterson et al. aus dem Jahr 2005 schon einmal ähnlich beschrieben. In dieser Studie schwankten der Erkrankungsbeginn *hSOD1*-transgener Mäuse zwischen 70 und 90 Tagen und die Überlebenszeit zwischen 102 und 166 Tagen. Die Schwankungen wurden auf die genetische Heterogenität der Mäuse zurückgeführt, die einerseits mit der Erzeugung des Transgenität einherging und andererseits durch die genetische Heterogenität der beiden Hintergrundstämme (SJL/J=SJL und C57BL/6J=B6) bedingt war (Heiman-Patterson et al. 2005).

Für das G93A-Mausmodell wurden von Chiu et al. in einer Studie aus dem Jahr 1995 der Erkrankungsbeginn im Alter von 90 Tagen und die Überlebenszeit mit 136 Tagen angegeben (Chiu et al. 1995). Ähnliche Daten mit einem Erkrankungsbeginn im Alter von 80 Tagen und Überlebenszeiten von höchstens 187 Tagen stammen von Dal Canto und Gurney in einer Studie aus dem Jahr 1995 (Dal Canto and Gurney 1995) und wurden in weiteren Studien verifiziert (Canton et al. 1998, Heiman-Patterson et al. 2005, Miana-Mena et al. 2005, Scott et al. 2008).

Der Vergleich der Ergebnisse dieser Studien mit denen der vorliegenden Studie zeigt, dass die Behandlung der transgenen Mäuse mit anle138b keine Verzögerung des Erkrankungsbeginns und Verlängerung der Überlebenszeit bewirkte.

Zur Feststellung des Erkrankungsbeginns wurden die transgenen Mäuse regelmäßig auf das Vorliegen eines Tremors ihrer Hinterläufe untersucht, der als eines der ersten motorischen Symptome den Beginn der Erkrankung anzeigt (Gurney et al. 1996). Da diese Methode allerdings sehr subjektiv ist und zudem viel Erfahrung auf Seiten des Untersuchers erfordert (Miana-Mena et al. 2005, Weydt et al. 2003), sollte der Krankheitsbeginn bei den transgenen Mäusen anhand von deren Leistungen im Laufrad- bzw. Rotarod-Versuch bestimmt werden. Dies ist zum einen objektiver und zum anderen sensitiver als die Untersuchung der transgenen Mäuse, denn dadurch kann noch vor dem Auftreten von klinischen Zeichen der Beginn der Erkrankung bei den transgenen Mäusen festgestellt werden. Zudem ist der Verlust von motorischen Fähigkeiten ein relativ spezifisches Zeichen für die ALS (Weydt et al. 2003).

Die Laufleistung stellte sich jedoch im Verlauf der Studie als ungeeigneter Parameter für die Bestimmung des Erkrankungsbeginns bei den verwendeten transgenen Mäusen heraus. Einige Mäuse erbrachten so schwankende oder aber kaum messbare Laufleistungen, dass bei diesen anhand der Laufleistung kein Zeitpunkt für den Erkrankungsbeginn bestimmt werden konnte. Deshalb wurde der Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns als der Zeitpunkt definiert, zu dem die Mäuse die vorgegebene Zeit auf dem Rotarod in drei Versuchen nicht mehr schafften.

Die objektivste und sensitivste Methode zur Erkennung des Erkrankungsbeginns bei transgenen Mäusen stellt die Gewichtsmessung dar. Ein Gewichtsverlust ist jedoch ein relativ unspezifisches Zeichen für die ALS, da dieser auch andere krankheitsunabhängige Ursachen haben kann (Weydt et al. 2003).

Die Überlebenszeit der transgenen Mäuse war gemäß den Regelungen des Tierschutzgesetzes durch drei verschiedene Endpunktkriterien begrenzt. Von den drei vor Beginn der Studie festgelegten Endpunktkriterien kam in dieser Studie allerdings nur eines zum Einsatz. Mit dem Verlust der motorischen Fähigkeiten, d.h. der Fähigkeit der transgenen Mäuse, sich innerhalb von 10s aus einer durch die Versuchsleitung hervorgerufenen Seitenlage zurück in die Ausgangsposition auf vier Pfoten zu drehen, konnte, wie bereits frühere Studien gezeigt haben[37], das Endstadium der Erkrankung zuverlässig festgestellt werden (Gurney et al. 1996, Gurney 1997, Gurney et al. 1998, Heiman-Patterson et al. 2005, Scott et al. 2008).

Die beiden anderen Endpunktkriterien, der Gewichtsverlust von mehr als 10% innerhalb einer Woche, ein Endpunktkriterium, das in ähnlicher Form auch in der Studie von Weydt et al. aus dem Jahr 2003 zum Einsatz kam (Weydt et al. 2003) [38], und die Abnahme der Laufleistung auf 10% der individuell erreichten Maximalleistung (Gurney 1997), wurden nicht angewandt. Ein Grund dafür war, dass der Verlust der motorischen Fähigkeiten früher auftrat als der Gewichtsverlust von mehr als 10% innerhalb einer Woche. Ein anderer war, dass die Abnahme der Laufleistung auf 10% der individuell erreichten Maximalleistung bei einigen Mäusen nicht zu ermitteln war, da diese während des gesamten Untersuchungszeitraums kaum messbare Laufleistungen erbracht hatten.

[37] In der Studie von Gurney et al. aus dem Jahr 1996 sowie den Studien von Heiman-Patterson et al. aus dem Jahr 2005 und Scott et al. aus dem Jahr 2008 wurden den Mäusen 30s Zeit gegeben, sich aus der Seitenlage wieder aufzurichten. In der Studie von Gurney et al. aus dem Jahr 1998 gab es keine zeitliche Begrenzung.

[38] In dieser Studie war ein Gewichtsverlust von mehr als 20% als Endpunktkriterium definiert.

4.2 Studiendesign

4.2.1 Versuchstiere (*hSOD1*-Mausmodell)

Das in der vorliegenden Studie eingesetzte *hSOD1*-Mausmodell, bei dem die transgenen Mäuse eine mutierte Form der humanen SOD1 exprimieren und daraufhin eine der humanen ALS ähnliche Motoneuronerkrankung ausprägen (Gurney 1994), stellte bis vor wenigen Jahren noch das einzige geeignete Tiermodell zur Entwicklung neuer Therapien für die ALS dar. Die in dieser Studie verwendeten transgenen Mäuse waren heterozygote Träger der am häufigsten für Forschungszwecke verwendeten G93A-Mutation des humanen *SOD1*-Gens mit einer Expression von 20 bis 30 Genkopien (Andersen 2006). Durch die hohe Anzahl an Genkopien mit einer hohen Expressionsrate der humanen SOD1 entwickeln die Mäuse bereits im Alter von drei bis vier Monaten erste motorische Symptome und erreichen im Alter von etwa fünf Monaten das Endstadium der Erkrankung (Chiu et al. 1995, Gurney et al. 1994).

Eine Problematik dieses Modells stellt die hohe Anzahl von 20 bis 30 Genkopien bei den transgenen Mäusen dar. Diese führt zwar zu einem frühen Beginn sowie raschen Fortschreiten der Erkrankung und ist damit hinsichtlich des Zeitaufwands und der Kosten für Forschungszwecke attraktiv, geht allerdings auch mit einigen histologischen Unterschieden zur humanen ALS einher, bei der die Expressionsrate der SOD1 wesentlich niedriger als bei den transgenen Mäusen ist (Andersen 2006, Gurney 1997, Shibata 2001).

Bei den verwendeten transgenen Mäusen treten im Gegensatz zur humanen ALS beispielsweise vakuoläre Veränderungen in den Motoneuronen des Rückenmarks und Hirnstamms auf. Das Fehlen von vakuolären Veränderungen bei der humanen ALS könnte allerdings damit erklärt werden, dass diese nur im Anfangsstadium der ALS zu sehen sind, das bei der humanen ALS nicht untersucht werden konnte.

Bei *hSOD1*-transgenen Mäusen, die lediglich eine oder wenige Kopien des humanen *SOD1*-Gens aufweisen, sind jedoch, wie bei der humanen ALS, histologisch keine vakuolären Veränderungen nachweisbar. Zudem würde die niedrigere Anzahl an Genkopien bei diesen Mäusen zu einem späteren Erkrankungsbeginn und längeren Erkrankungsverlauf führen (Gurney 1997, Shibata 2001) und die humane ALS damit besser repräsentieren. Allerdings würde der Krankheitsverlauf bei diesen Mäusen mit einer Überlebenszeit von bis zu einem Jahr einen erheblich größeren Zeitaufwand und wesentlich mehr Kosten verursachen, sodass dieses Modell in der ALS-Therapieforschung kaum zum Einsatz kommt (Gurney 1997). Auch in der

vorliegenden Studie wurde deshalb, wie in vielen anderen Studien, auf transgene Mäuse mit einer hohen Anzahl an Genkopien zurückgegriffen (Heiman-Patterson et al. 2005, Scott et al. 2008, Smittkamp et al. 2008).

Der Hintergrundstamm B6SJL aus dem *Jackson Laboratory*, der in der vorliegenden Studie bei der Züchtung der Mäuse zum Einsatz kam, wurde schon in zahlreichen anderen Studien verwendet (Canton et al. 1998, Gurney et al. 1996, Gurney et al. 1998, Scott et al. 2008, Smittkamp et al. 2008). Die Auswahl dieses Hintergrundstamms könnte allerdings nicht nur das Verhalten sondern auch den Krankheitsverlauf der Mäuse in der vorliegenden Studie beeinflusst haben (Karl et al. 2003).

In der Studie von Heiman-Patterson et al. aus dem Jahr 2005 wird für *hSOD1*-transgene Mäuse des kongenen Hintergrundstamms SJL ein schwererer und für Mäuse des kongenen Hintergrundstamms B6 ein milderer Phänotyp als für Mäuse des Hintergrundstamms B6SJL beschrieben. Neben dem Einfluss verschiedener Hintergrundstämme (B6SJL, SJL, B6) auf den Phänotyp wurde in dieser Studie der Einfluss des Geschlechts auf das Überleben *hSOD1*-transgener Mäuse untersucht. Dabei zeigte sich, dass Mäuse des Hintergrundstamms B6SJL, vergleichbar mit den Überlebenszeiten der transgenen Mäuse der vorliegenden Studie, durchschnittlich 130 Tage überlebten, wobei weibliche Mäuse signifikant länger überlebten als männliche. Mäuse des Hintergrundstamms SJL überlebten signifikant kürzer als Mäuse des Hintergrundstamms B6SJL und wiesen dazu einen noch deutlicheren Geschlechterunterschied auf. Mäuse des Hintergrundstamms B6 überlebten dagegen signifikant länger als Mäuse des Hintergrundstamms B6SJL, wobei kein Geschlechterunterschied feststellbar war (Heiman-Patterson et al. 2005).

In einer Studie von Veldink et al. aus dem Jahr 2003 stellte sich zudem heraus, dass weibliche Mäuse signifikant später erkrankten als männliche (Veldink et al. 2003).

Die beiden Studien von Heiman-Patterson et al. und Veldink et al. haben gezeigt, dass sowohl das Geschlecht als auch der Hintergrundstamm Einfluss auf den Erkrankungsbeginn sowie die Überlebenszeit *hSOD1*-transgener Mäuse haben. Dies muss bei der Interpretation von Studien berücksichtigt werden, um zu vermeiden, dass Unterschiede hinsichtlich des Krankheitsverlaufs transgener Mäuse, die einer bestimmten Therapie zugeschrieben werden, nicht durch den Hintergrundstamm oder das Geschlecht der verwendeten Mäuse bedingt sind.

In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich weibliche Mäuse des Hintergrundstamms B6SJL eingesetzt, weil für diese die längsten Überlebenszeiten

beschrieben worden waren. Dadurch sollten mögliche Unterschiede im Hinblick auf die Überlebenszeiten der verschiedenen Gruppen deutlicher sein.

In der tierexperimentellen Forschung werden männliche Versuchstiere häufig weiblichen vorgezogen. Als Begründung dafür wird angeführt, dass weibliche Versuchstiere einen Hormonzyklus haben, auf den bestimmte physiologische Verhaltensweisen zurückzuführen sind, die bei männlichen nicht zu beobachten sind und stärker schwankende Versuchsergebnisse hervorrufen. Dies konnte bisher jedoch in keiner Studie belegt werden (Zucker and Beery 2010).

In der vorliegenden Studie wurden, wie in einer ähnlichen Studie von Smittkamp et al. aus dem Jahr 2008, nur weibliche Mäuse verwendet (Smittkamp et al. 2008). Um eine geschlechterübergreifende Aussage bezüglich der Wirksamkeit der Behandlung mit anle138b treffen zu können, wäre eine weitere Studie nötig, in der ausschließlich männliche Mäuse einer Behandlung mit anle138b unterzogen werden müssten.

In anderen Studien kamen sowohl männliche als auch weibliche Mäuse zum Einsatz, die allerdings aufgrund physiologischer, geschlechtsbedingter Unterschiede, nicht direkt miteinander verglichen werden konnten (Gurney et al. 1998, Miana-Mena et al. 2005, Scott et al. 2008, Weydt et al. 2003). Einerseits sind männliche Mäuse schwerer und auch kräftiger als weibliche Mäuse. Andererseits weisen männliche Mäuse einen früheren Erkrankungsbeginn und kürzeren Erkrankungsverlauf als weibliche Mäuse auf (Miana-Mena et al. 2005, Veldink et al. 2003). Demnach würden jegliche Unterschiede hinsichtlich der motorischen Fähigkeiten bzw. des Krankheitsverlaufs bei einem direkten Vergleich von männlichen und weiblichen Mäusen immer dem Einfluss des Geschlechts unterliegen.

Im Gegensatz zu den Leistungen der transgenen Mäuse im Grip-Strength- und im Rotarod-Versuch, die nur einmal wöchentlich durchgeführt wurden, war die Laufleistung, die kontinuierlich erfasst wurde, großen Schwankungen unterworfen.

Diese Schwankungen könnten hormonell bedingt gewesen sein (Zucker and Beery 2010). Dazu passt, dass einige Mäuse im Verlauf der Studie, mit der Streu Nester in den Laufrädern bauten, sodass sich diese nicht mehr drehen konnten.

In einer Studie von Gurney et al. aus dem Jahr 1998 waren die Laufleistungen weiblicher Mäuse allerdings besser als die männlicher Mäuse (Gurney et al. 1998), was eher dafür spricht, dass bestimmte Eigenschaften des Hintergrundstamms B6SJL für die Schwankungen der Laufleistungen in dieser Studie verantwortlich zu machen sind.

Bei der Beobachtung des Verhaltens der transgenen Mäuse in der vorliegenden Studie fiel zudem auf, dass diese deutlich nervöser und dementsprechend auch aktiver als die Wildtyp-Mäuse waren. Dies könnte eine Erklärung für die besseren Laufleistungen der transgenen Mäuse, vor allem die höhere Anzahl an Läufen und die höhere Gesamtlaufzeit sowie die größeren Distanzen, insbesondere in den ersten zehn Wochen des Untersuchungszeitraums vor Beginn der Erkrankung sein. Außerdem könnte dieses Verhalten ein Grund für die längere Gewöhnung der transgenen Mäuse an das Rotarod gewesen sein, die sich in den schwächeren Leistungen der transgenen Mäuse gegenüber den Wildtyp-Mäusen im Rotarod-Versuch in den ersten Wochen des Untersuchungszeitraums widerspiegelt.
In einer Studie von Leichsenring et al. aus dem Jahr 2006 waren bei *hSOD1*-transgenen Mäusen bereits vermehrt angstbasierte Verhaltensweisen aufgefallen (Leichsenring et al. 2006).

4.2.2 Statistische Methoden

Die Versuchsdaten wurden neben Log-Rank Tests mittels einer parametrischen bzw. einer nichtparametrischen Varianzanalyse auf statistische Signifikanz überprüft. Für die Auswertung von Daten mithilfe dieser Verfahren sind ausreichend große Untersuchungsgruppen nötig, damit Schwankungen innerhalb einer Gruppe aufgrund interindividueller Unterschiede beim Vergleich der Gruppen untereinander nicht ins Gewicht fallen (Karl et al. 2003). Bei tierexperimentellen Studien sollte eine Untersuchungsgruppe aus mindestens zehn Mäusen bestehen (Crawley 1999). Da im Hinblick auf die Laufleistung interindividuell größere Schwankungen zu erwarten waren, wurde in der vorliegenden Studie eine Gruppengröße von 20 Mäusen gewählt. Die Schwankungen der Laufleistungen der in der vorliegenden Studie verwendeten Mäuse waren jedoch viel größer als in ähnlichen Studien (Gurney et al. 1996, Gurney et al. 1998) und unabhängig davon, ob es sich um transgene oder Wildtyp- bzw. behandelte oder nicht behandelte Mäuse handelte. Dadurch wurden die Gruppenvergleiche schon zu Beginn des Untersuchungszeitraums beeinflusst. Da die Gruppengrößen im Verlauf der Studie aufgrund der unterschiedlich langen Krankheitsverläufe der transgenen Mäuse nicht konstant blieben, wurde der Einfluss dieser Schwankungen auf die Gruppenvergleiche am Ende des Untersuchungszeitraums noch größer.
Mit der Abnahme der Gruppengrößen im Verlauf der Studie lässt sich auch der unerwartete Gewichts- bzw. Leistungsabfall der nicht behandelten Wildtyp-Mäuse

(Gruppe 4) in der letzten Woche des Untersuchungszeitraums erklären. In dieser Gruppe waren am Ende nur noch Mäuse übrig, die im gesamten Untersuchungszeitraum schon leichter waren bzw. schwächere Leistungen erbracht hatten. Außerdem kann die Gewichts- bzw. Leistungsstagnation der nicht behandelten transgenen Mäuse (Gruppe 2) in den letzten Wochen des Untersuchungszeitraums auf die Abnahme der Gruppengrößen zurückgeführt werden. Allerdings waren in dieser Gruppe zuletzt nur noch Mäuse übrig, die im gesamten Untersuchungszeitraum schon schwerer waren bzw. bessere Leistungen erbracht hatten.

Die Abnahme der Gruppengrößen war auch der Grund dafür, dass die letzten beiden Wochen des Untersuchungszeitraums (16. und 17. Woche) nicht ausgewertet werden konnten, weil die Anzahl an Mäusen pro Gruppe zu gering war.

4.3 Anle138b und die Proteinaggregationshypothese

Die Grundlage für diese Studie bildete die Hypothese, dass die Aggregation des Proteins SOD1 die Ursache für die Motoneuronendegeneration bei der ALS und die dadurch bedingten motorischen Symptome darstellt (Soto 2003). Die Hemmung der SOD1-Aggregatbildung sollte demnach die motorischen Fähigkeiten und den Krankheitsverlauf von *hSOD1*-transgenen Mäusen positiv beeinflussen und möglicherweise auch einen neuroprotektiven Effekt aufweisen. Die Behandlung der transgenen Mäuse mit dem Proteinaggregationshemmstoff anle138b in der vorliegenden Studie hatte jedoch keine Auswirkungen auf deren motorische Fähigkeiten oder deren Krankheitsverlauf. Daher ist anzunehmen, dass durch die Hemmung der SOD1-Aggregatbildung die Degeneration der Motoneurone in den transgenen Mäusen nicht verhindert werden konnte. Mögliche neuroprotektive Eigenschaften von anle138b wurden in der vorliegenden Studie nicht näher untersucht, erscheinen damit aber auch eher unwahrscheinlich.

Ein Grund dafür, dass anle138b in der vorliegenden Studie keine Wirkung zeigte, könnte sein, dass die Aggregatbildung nicht die einzige Ursache für die Motoneuronendegeneration bei der ALS sondern nur die Endstrecke unterschiedlicher Pathomechanismen darstellt. Die alleinige Hemmung der Proteinaggregation wäre dementsprechend nicht ausreichend, um die Motoneuronendegeneration und damit die motorischen Fähigkeiten bzw. den Krankheitsverlauf von *hSOD1*-trangenen Mäusen zu beeinflussen.

Vorangegangene Untersuchungen mit anle138b in Mausmodellen für die Prion- und die Parkinsonerkrankung deuten darauf hin, dass die Proteinaggregate bei der ALS

nicht die entscheidende pathophysiologische Bedeutung haben wie die Proteinaggregate bei diesen Erkrankungen. Im Unterschied zu der vorliegenden Studie konnte in Studien mit den Mausmodellen für die Prion- bzw. die Parkinsonerkrankung eine signifikante Überlebenszeitverlängerung bzw. eine Reduktion krankheitsassoziierter Verhaltensdefizite sowie eine Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens durch eine Behandlung mit anle138b erreicht werden. In vitro war bei der Parkinsonerkrankung eine Hemmung der Bildung von α-Synuclein-Aggregaten und bei der Prionerkrankung eine Hemmung der Bildung von Prionproteinaggregaten durch anle138b nachweisbar (Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Griesinger). Da in vitro bisher keine Hemmung der SOD1-Aggregatbildung durch anle138b nachgewiesen konnte, ist nicht auszuschließen, dass die SOD1-Aggregatbildung bei der ALS im Gegensatz zu der Proteinaggregation bei der Prion- und der Parkinsonerkrankung aufgrund struktureller Unterschiede der Aggregate durch anle138b nicht gehemmt werden konnte und deshalb kein Effekt im *hSOD1*-Mausmodell nachweisbar war.

In einer Studie von Kerman et al. aus dem Jahr 2010 zeigte sich, dass sowohl die Proteinaggregate bei der SOD1-assoziierten ALS als auch die Proteinaggregate bei der sporadischen ALS keine amyloiden Strukturen wie z.B. die Proteinaggregate bei der Parkinsonerkrankung sondern ungeordnete, amorphe Aggregate bildeten (Kerman et al. 2010).

Es könnte allerdings auch sein, dass die Proteinaggregation gar nicht die Ursache für die Degeneration der Motoneurone sondern nur eine Begleiterscheinung oder sogar einen protektiven Mechanismus bei der ALS darstellt (Lansbury and Lashuel 2006). Die Hypothese, dass die Proteinaggregate nur eine Begleiterscheinung bei der ALS darstellen, wäre mit der vorliegenden Studie in Einklang zu bringen, da der Krankheitsverlauf der transgenen Mäuse durch die Behandlung mit dem Proteinaggregationshemmstoff anle138b unbeeinflusst blieb, wohingegen für die Hypothese, dass die Proteinaggregate einen protektiven Mechanismus bei der ALS darstellen, ein negativer Einfluss auf den Krankheitsverlauf der transgenen Mäuse durch die Behandlung mit einem Proteinaggregationshemmstoff zu erwarten gewesen wäre. Dies war nicht der Fall war, sodass diese Hypothese unwahrscheinlich ist.

In Betracht gezogen werden muss außerdem, dass anle138b aufgrund der Dosierung des Wirkstoffs keinen Effekt hatte. Anle138b wurde bereits mehrfach an

Mäusen getestet und zeigte dabei in therapeutischer Dosierung eine gute orale Bioverfügbarkeit sowie ZNS-Gängigkeit. Die vorliegende Studie bestätigte, dass anle138b in Mäusen keinerlei Toxizität hervorruft und ergab zudem, dass anle138b keine anabolen Eigenschaften aufweist. Es ist allerdings möglich, dass die in dieser Studie gewählte Dosierung (1mg anle138b/g Futter bei einer durchschnittlichen Futteraufnahme von 5g/Tag pro Maus) für die Hemmung der Proteinaggregation in *hSOD1*-transgenen Mäusen nicht hoch genug war bzw. dass kein für die Hemmung der Proteinaggregation ausreichend hoher Wirkspiegel im ZNS der transgenen Mäuse erzeugt werden konnte. Um zu klären, ob die Dosierung Einfluss auf die Wirksamkeit von anle138b hat, müssten in weiteren Studien andere Dosierungen von anle138b bei *hSOD1*-transgenen Mäusen getestet werden.

Darüber hinaus könnte die Wirkung von anle138b durch die Applikationsform des Wirkstoffs beeinflusst worden sein. Anle138b war dem Futter der behandelten Mäuse (Gruppe 1 und 3) beigemischt, wodurch relativ stabile Wirkspiegel im ZNS der Mäuse aufgebaut werden können, wie sich in vorherigen Untersuchungen mit diesem Wirkstoff (Daten der eigenen Arbeitsgruppe) sowie in ähnlichen Studien mit anderen Wirkstoffen herausgestellt hatte (Gurney et al. 1998). Bei den transgenen Mäusen, die im Verlauf der Erkrankung trotz eines erleichterten Zugangs zu Futter nicht mehr in demselben Maß wie vor Beginn der Erkrankung in der Lage waren Futter und damit den Wirkstoff aufzunehmen, könnte es aber zu schwankenden Wirkspiegeln und damit eventuell zu einer Beeinträchtigung der Wirkung von anle138b gekommen sein. Eine andere Applikationsform, durch die möglicherweise konstantere Wirkspiegel hätten gewährleistet werden können, wäre die separate Verabreichung des Wirkstoffs gewesen, z.B. über eine von außen in den Käfig gegebene Spritze mit Erdnussbutter. Dieses Vorgehen wäre jedoch mit einem wesentlich größeren organisatorischen und zeitlichen Aufwand sowie einer stärkeren Beeinflussung der Mäuse einhergegangen und wurde daher nicht gewählt.

4.4 Konsequenzen für die klinische Therapieforschung

Welche Konsequenzen können aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie für die klinische ALS-Therapieforschung gezogen werden, trotz dessen dass die Behandlung *hSOD1*-transgener Mäuse mit dem Proteinaggregationshemmstoff anle138b keinen Einfluss auf deren motorische Fähigkeiten bzw. deren Krankheitsverlauf hatte und vermutlich auch keinen neuroprotektiven Effekt aufweist?

Das Hauptproblem in der ALS-Therapieforschung ist, dass die eigentliche Ursache und der Pathomechanismus der ALS, insbesondere der sporadischen Form, immer noch unbekannt sind. Bei der Entwicklung neuer Therapien konnte daher, wie in der vorliegenden Studie, bislang nur auf Hypothesen über den Mechanismus, der für den Untergang der motorischen Nervenzellen bei der ALS verantwortlich ist, zurückgegriffen werden. Dabei ist fraglich, ob es überhaupt einen gemeinsamen Pathomechanismus für die unterschiedlichen Formen der ALS gibt und ob es demnach überhaupt eine einheitliche Therapie für die sporadische und die familiäre Form der ALS geben kann.

Derzeit kommt die einzige für die Behandlung der ALS zugelassene Substanz Riluzol im klinischen Alltag sowohl bei ALS-Patienten mit familiärer als auch sporadischer Form zum Einsatz. Riluzol bewirkt allerdings nur eine geringe Verlängerung der Überlebenszeit der Patienten, wobei die Reduktion der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität von Bedeutung zu sein scheint (Bensimon et al. 1994, Lacomblez et al. 1996). Der genaue Mechanismus, der der neuroprotektiven Wirkung von Riluzol zugrunde liegt, ist allerdings noch unklar.

Die familiäre und die sporadische Form der ALS sind klinisch nicht voneinander zu unterscheiden (Emery and Holloway 1982) und beide durch einen fortschreitenden Verlust motorischer Nervenzellen mit intrazellulären Proteinablagerungen gekennzeichnet (Brooks 1994, Brooks et al. 2000, Leigh et al. 1991). Daher wurde angenommen, dass beiden ALS-Formen auch ähnliche neurodegenerative Mechanismen zugrunde liegen. Neuere Forschungsergebnisse zeigten jedoch, dass die Fehlfaltung und Aggregation des Proteins SOD1 nur bei der familiären, SOD1-assoziierten Form der ALS, die nur 5 bis 10% der ALS-Fälle ausmacht, nicht aber bei der sporadischen Form der ALS mit mehr als 90% der ALS-Fälle, eine zentrale Rolle in der Pathogenese spielt (Andersen 2006, Kerman 2010, Kurland and Mulder 1955, Mulder et al. 1986) und die experimentelle Therapieforschung unter Verwendung des *hSOD1*-Mausmodells demnach nicht zwangsläufig Aufschluss über einen gemeinsamen Pathomechanismus bzw. eine einheitliche Therapie der ALS geben muss.

Dies wirft die Frage auf, ob das in der vorliegenden Studie verwendete *hSOD1*-Mausmodell, das nur einen geringen Prozentsatz der ALS-Fälle repräsentiert, überhaupt ein geeignetes Modell für das Studium der Pathogenese und die Entwicklung einer Therapie der ALS ist (Van der Worp et al. 2010). Für die Substanz

Riluzol wurde jedoch sowohl im *hSOD1*-Mausmodell als auch bei ALS-Patienten eine geringe Verlängerung der Überlebenszeit nachgewiesen (Bensimon et al. 1994, Gurney et al. 1996, Lacomblez et al. 1996). Eine positive Beeinflussung der motorischen Fähigkeiten durch Riluzol konnte dagegen nur bei Mäusen nicht aber bei ALS-Patienten festgestellt werden (Gurney et al. 1998).

Bis vor wenigen Jahren war das *hSOD1*-Mausmodell das einzige Tiermodell, das in der ALS-Forschung zum Einsatz kam, aber inzwischen sind auf Grundlage der bei der ALS gefundenen Mutationen verschiedener Proteine neue Tiermodelle entwickelt worden bzw. werden entwickelt. Ein Beispiel ist das *TDP-43*-Mausmodell, das nicht nur familiäre sondern auch sporadische Formen der ALS repräsentiert, und damit eventuell besser für die experimentelle Therapieforschung geeignet sein könnte (Kabashi et al. 2008, Sreedharan et al. 2008, Wegorzewska et al. 2009, Wils et al. 2010). Allerdings waren nicht nur bei *TDP-43*-transgenen Mäusen, die eine mutierte Form des humanen TDP-43-Proteins exprimierten, die typischen klinischen Zeichen und die Degeneration von Motoneuronen wie bei der humanen ALS nachweisbar sondern auch bei *TDP-43*-transgenen Mäusen, die eine Wildtyp-Form des humanen TDP-43-Proteins überexprimierten. Da Mutationen im *TDP-43*-Gen auch nur bei einem Teil der familiären und sporadischen ALS-Fälle nachweisbar sind (Kabashi et al. 2008, Sreedharan et al. 2008), ist dies ein Hinweis darauf, dass das Protein TDP-43 unabhängig von Mutationen relevant für die ALS ist (Wils et al. 2010).

Einerseits könnte das *hSOD1*-Mausmodell eine Rolle dabei gespielt haben, dass bei zahlreichen in Tierversuchen erfolgreich getesteten Substanzen in der klinischen Erprobung die Wirkung ausblieb. Andererseits könnte dies aber auch daran liegen, dass Tiermodelle die Pathophysiologie im Menschen häufig nur bedingt repräsentieren.

Versuchstiere sind bei Beginn ihrer Erkrankung meist noch relativ jung und haben zudem keine Begleiterkrankungen (Hackam 2007). Die transgenen Mäuse in der vorliegenden Studie waren zu Beginn der Erkrankung im Mittel 114 Tage alt. Die meisten ALS-Patienten erkranken dagegen im höheren Lebensalter. Das mittlere Erkrankungsalter bei der sporadischen Form der ALS liegt zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr und bei der familiären Form um das 50. Lebensjahr (Wijesekera and Leigh 2009). Dazu haben gerade ältere ALS-Patienten häufig Begleiterkrankungen und nehmen dementsprechend Medikamente ein, die den Verlauf sowie die Therapie der ALS beeinflussen können.

Zurzeit kann allerdings noch nicht auf Tierversuche verzichtet werden, selbst wenn die Ergebnisse solcher Versuche nicht unmittelbar auf den Menschen übertragbar sind.

In einer Studie von Perel et al. aus dem Jahr 2007 wurde die Wirksamkeit verschiedener Therapien in klinischen Studien mit der Wirksamkeit dieser Therapien in den entsprechenden tierexperimentellen Studien verglichen, wobei nur in der Hälfte der Fälle die Ergebnisse der Tierversuche mit den Ergebnissen der klinischen Studien übereinstimmten. Die Forscher führten dies darauf zurück, dass die Studien entweder systematische Fehler aufwiesen oder die Tiermodelle die humane Erkrankung nur bedingt repräsentierten (Perel et al. 2007).

In einer anderen Studie von Hackam und Redelmeier aus dem Jahr 2006 wurden 76 Tierversuche, in denen ein präventiver oder therapeutischer Effekt einer medikamentösen Behandlung nachgewiesen werden konnte, mit den dazugehörigen klinischen Studien verglichen. Dabei zeigte sich, dass nur bei einem Drittel der Wirkstoffe, die in Tierversuchen erfolgreich getestet worden waren, der Effekt in klinischen Studien repliziert werden konnte und ein Zehntel der Wirkstoffe später für den klinischen Gebrauch zugelassen wurde (Hackam and Redelmeier 2006). Hackam und Redelmeier begründeten dies ähnlich wie Perel et al. mit methodischen Schwächen der Studien bzw. unzureichender Repräsentativität der verwendeten Tiermodelle.

Außerdem muss die Art und Weise sowie die Dauer der Verabreichung der Wirkstoffe berücksichtigt werden (Hackam 2007). In Tierversuchen wird, wie in der vorliegenden Studie, mit der Gabe von Wirkstoffen meist schon vor dem Beginn der Erkrankung bei den Versuchstieren begonnen, während im klinischen Alltag, insbesondere in klinischen Studien, erst nach definitiver Diagnosestellung und damit häufig sehr spät therapiert wird. Eine Studie von Gurney et al. aus dem Jahr 1998 scheint dies zu belegen. In dieser Studie wurde durch eine frühzeitige Behandlung *hSOD1*-transgener Mäuse mit Riluzol eine längere Erhaltung von deren motorischen Fähigkeiten erzielt, die in klinischen Studien, in denen erst nach Diagnosestellung anhand der El Escorial-Kriterien behandelt wurde, nicht reproduziert werden konnte (Bensimon et al. 1994, Gurney et al. 1998, Lacomblez et al. 1996). Dabei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass die kontinuierliche Aufnahme von Riluzol durch die transgenen Mäuse in dieser Studie als Futterzusatz bzw. in einer vorherigen Studie von Gurney et al. aus dem Jahr 1996 als Zusatz zu Wasser

gegenüber der intermittierenden Einnahme von Riluzol durch ALS-Patienten ebenfalls Einfluss auf die unterschiedlichen Studienergebnisse gehabt haben könnte (Gurney et al. 1996, Gurney et al. 1998).

Neue Wirkstoffe können aus vielen Gründen nicht direkt an Menschen getestet werden und müssen wie anle138b zunächst in Tierversuchen auf ihre Wirkungen und Nebenwirkungen hin untersucht werden. In Tierversuchen besteht die Möglichkeit sowohl genetische als auch Umweltfaktoren zu beeinflussen. Darüber hinaus werden Wirkstoffe, die sich in Tierversuchen als unwirksam oder nebenwirkungsreich bzw. toxisch herausgestellt haben, nicht in klinischen Studien überprüft und können somit nicht unnötig oder sogar schadhaft an Menschen erprobt werden. Außerdem ermöglichen Tierversuche einen Erkenntnisgewinn im Hinblick auf die Ursachen und die Pathophysiologie von Erkrankungen und eröffnen damit eventuell ganz neue therapeutische Ansätze (Hackam 2007). Bei der Vorhersage von Wirkungen und Nebenwirkungen eines Wirkstoffs in Menschen auf der Grundlage von Erkenntnissen aus Tierversuchen dürfen physiologische Unterschiede zwischen Tieren und Menschen aber nicht vernachlässigt werden. Im Hinblick auf die ALS muss bei der Interpretation von tierexperimentell gewonnenen Forschungsergebnissen beispielsweise beachtet werden, dass es grundlegende Unterschiede zwischen dem UMN-System von Mäusen und Menschen gibt, das bei der ALS von zentraler Bedeutung ist (Andersen 2006).

In der vorliegenden Studie konnten durch die Behandlung mit anle138b die motorischen Fähigkeiten und der Krankheitsverlauf *hSOD1*-transgener Mäuse nicht positiv beeinflusst werden.

Damit ist anle138b eine weitere Substanz, die – zumindest in dieser Studie - ohne den erhofften Erfolg im *hSOD1*-Mausmodell getestet wurde und deshalb ohne weitere tierexperimentelle Studien vermutlich nicht in klinischen Studien zum Einsatz kommen wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stellen im Hinblick auf die Entwicklung einer neuen Therapie für die ALS damit zwar eine Enttäuschung dar, bedeuten für die ALS-Therapieforschung gleichzeitig aber auch einen Erkenntnisgewinn hinsichtlich der Frage nach dem Pathomechanismus der ALS. Die vorliegende Studie lässt den Rückschluss zu, dass die Proteinaggregation nicht den entscheidenden pathogenetischen Mechanismus bei der ALS darstellt.

Weitere Studien müssen durchgeführt werden, um die Frage nach der/den Ursache/n bzw. dem Pathomechanismus der ALS bald beantworten und die ALS kurativ

behandeln zu können. Mit diesem Wissen könnte dann vielleicht auch eine bessere Aussage über Erkrankungswahrscheinlichkeiten und Möglichkeiten der Prävention getroffen werden.

5 Zusammenfassung

5.1 Überblick

Die ALS ist eine neurodegenerative Erkrankung, bei der der Untergang des ersten und zweiten Motoneurons gleichzeitig spastische und schlaffe Paresen hervorruft. Obwohl die ALS mit einer Inzidenz von 2 auf 100.000 Menschen pro Jahr die häufigste Motoneuronerkrankung ist und mit einer mittleren Erkrankungsdauer von nur drei bis fünf Jahren eine sehr schlechte Prognose aufweist, konnte der Pathomechanismus der ALS bislang noch nicht aufgeklärt und eine kausale Therapie entwickelt werden. Es gibt jedoch eine familiäre Form der ALS mit genetischem Hintergrund, die etwa 10% der ALS-Fälle ausmacht (familiäre ALS). Am häufigsten mit 10 bis 20% der fALS-Fälle treten dabei Mutationen im Gen des Proteins Superoxiddismutase 1 (SOD1) auf. Die übrigen 90% der ALS-Fälle haben eine unbekannte Ursache (sporadische ALS). Es existieren viele verschiedene Hypothesen zur Erklärung der pathophysiologischen Vorgänge, die für den Untergang der Motoneurone verantwortlich sind. Eine dieser Hypothesen ist die sogenannte Proteinaggregationshypothese, bei der die Aggregation und Akkumulation von verschiedenen Proteinen als Ursache für die Motoneuronendegeneration angesehen wird. Grundlage dafür ist, dass insbesondere die familiären, SOD1-assoziierten ALS-Formen durch Proteinaggregate gekennzeichnet sind.

5.2 Studiendesign

Um die Proteinaggregationshypothese zu überprüfen und möglicherweise eine neue Therapie für die ALS zu entwickeln, wurde in der vorliegenden Studie unter Verwendung des *hSOD1*-Mausmodells für die ALS der Proteinaggregations-hemmstoff anle138b untersucht. Dazu wurden *hSOD1*-transgene Mäuse (n=20) einer Behandlung mit anle138b unterzogen und mit *hSOD1*-transgenen Mäusen (n=20), die Placebo erhielten, verglichen. Mithilfe von drei Versuchen zur Überprüfung der motorischen Fähigkeiten der Mäuse, dem Laufrad-, Grip-Strength- und Rotarod-Versuch, sowie einer Gewichtsmessung wurden der Beginn und das Fortschreiten der Erkrankung beobachtet. Zusätzlich wurde die Überlebenszeit der Mäuse bestimmt.

5.3 Ergebnisse

Die Auswertung der Versuchsdaten ergab, dass durch die Behandlung mit anle138b die motorischen Fähigkeiten sowie der Gewichtsverlauf der transgenen Mäuse nicht beeinflusst werden konnte. Es konnte weder ein späterer Erkrankungsbeginn (115±14 Tage[39]) noch eine Überlebenszeitverlängerung (135±8 Tage) bei den behandelten transgenen Mäusen im Vergleich zu den nicht behandelten transgenen Mäusen (Erkrankungsbeginn 113±19Tage, Überlebenszeit 133±10 Tage) erreicht werden.

5.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Studie legen die Annahme nahe, dass die SOD1-Aggregatbildung nicht der entscheidende Faktor bei der Motoneuronendegeneration der ALS ist, da durch den Proteinaggregationshemmstoff anle138b weder die motorischen Fähigkeiten und damit der Erkrankungsbeginn und -verlauf noch die Überlebenszeit der *hSOD1*-transgenen Mäuse beeinflusst wurde.

[39] Die Angaben beziehen sich auf den Mittelwert und die Standardabweichung.

6 Literaturverzeichnis

Andersen PM (2006): Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. Curr Neurol Neurosci Rep 6, 37-46

Andersen PM, Borasio GD, Dengler R, Hardiman O, Kollewe K, Leigh PN, Pradat PF, Silani V, Tomik B (2005): EFNS task force on management of amyotrophic lateral sclerosis: guidelines for diagnosing and clinical care of patients and relatives. Eur J Neurol 12, 921–938

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, 602-611

Aran FA (1850): Recherches sur une maladie non encore décrite du système musculaire (atrophie musculaire progressive). Arch Gen Med 14, 5-35, 172-214

Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften (AWMF): Amyotrophe Lateralsklerose (Motoneuronerkrankungen); in: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 4. überarbeitete Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2008

Bell C: An idea of a new anatomy of the brain. Strahan & Preston, London 1811

Bell C: The nervous system of the human body. Longman, Rees, Orme, Brown and Green, London 1830

Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V and the ALS/Riluzole Study Group (1994): A controlled trial of Riluzole in amyothrophic lateral sclerosis. N Engl J Med 330, 585-591

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L with Gatto Jr. GJ: Biochemistry. 7. Auflage; W. H. Freeman and Company, New York 2012

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

Borchelt DR, Guarnierie M, Wong PC, Lee MK, Slunt HS, Xu ZS, Sisodia SS, Price DL, Cleveland DW (1995): Superoxide dismutase 1 subunits with mutations linked to famlial amyotrophic lateral sclerosis do not affect wild-type subunit function. J Biol Chem 270, 3234-3238

Bourke SC, Bullock RE, Williams TL, Shaw PJ, Gibson GJ (2003): Noninvasive ventilation in ALS. Indications and effect on quality of life. Neurology 61, 171-177

Bourke SC, Tomlinson M, Williams TL, Bullock RE, Shaw PJ, Gibson GJ (2006): Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. Lancet Neurol 5, 140-147

Braunstein KE: Untersuchungen von Motorik, Kognition und Verhalten bei Mausmodellen von Motoneuronerkrankungen. Naturwiss. Diss. Ulm 2008

Brooks BR for the World Federation of Neuology Research Group on neuromuscular diseases (1994): El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci 124, 96-107

Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL for the World Federation of Neuology Research Group on neuromuscular diseases (2000): El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 1, 293-299

Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL (1997): ALS-linked SOD1-mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. Neuron 18, 327-338

Bucciantini M, Giannoni E, Chitit F, Baroni F, Formigli L, Zurdo J, Taddei N, Ramponi G, Dobson CM, Stefani M (2002): Inherent toxicity of aggregation implies a common mechanism for protein misfolding diseases. Nat 416, 507-511

Buratti E, Dörk T, Zuccato E, Pagani F, Romano M, Baralle FE (2001): Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. EMBO J 20, 1774-1784

Canton T, Pratt J, Stutzmann JM, Imperato A, Boireau A (1998): Glutamate uptake is decreased tardively in the spinal cord of FALS mice. Neuroreport 9, 775-778

Canton T, Bohme GA, Boireau A, Bordier F, Mignani S, Jimonet P, Jahn G, Alavijeh M, Stygall J, Roberts S (2001): RPR 119990, a novel alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazoleproprionic acid antagonist: synthesis, pharmacological properties, and activity in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. J Pharmacol Exp Ther 299, 314-322

Charcot JM: Leçons sur les maladies du système nerveux: faites à la Salpetrière. Dalahaye, Paris 1872-73

Charcot JM (1874): De la sclérose latérale amyotrophique. Prog Med 2, 325-327, 341-342, 453-455

Charcot JM, Joffroy A (1869): Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. Arch de Physiol Norm Pathol 2, 354-367, 628-649, 744-757

Chattopadhyay M, Valentine JS (2009): Aggregation of copper-zinc superoxide dismutase in familial and sporadic ALS. Antioxid Redox Signal 11, 1603-1614

Chiò A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G (2005): Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. Brain 128, 472-476

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

Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY (1992): Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. Proc Natl Acad Sci USA 89, 10405-10409

Crawley JN (1999): Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. Brain Res 835, 18-26

Crozat A, Aman P, Mandahl N, Ron D (1993): Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. Nature 363, 640-644

Cruveilhier J (1853): Sur le paralysie musculaire progressive atrophique. Bull Acad Med 18, 490–501, 546–583

Dal Canto MC, Gurney ME (1994): Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. Am J Pathol 145, 1271-1279

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

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

DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve B, 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, 245-256

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, 1047-1051

Deng HX, Shi Y, Furukawa Y, Zhai H, Fu R, Liu E, Gorrie GH, Khan MS, Hung WY, Bigio EH (2006): Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. Proc Natl Acad Sci 103, 7142-7147

Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, Yang Y, Fecto F, Shi Y, Zhai H (2011): Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linkes juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. Nature 477, 211-217

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

Desport JC, Preux PM, Truong TC, Vallat, JM, Sautereau D, Couratier P (1999): Nutritional status is a prognostic factor for survival in ALS patients. Neurology 53, 1059-1063

Desport JC, Preux PM, Truong CT, Courat L, Vallat JM, Couratier P (2000): Nutritional assessment and survival in ALS patients. ALS Other Motor Neuron Disord 1, 91-96

Dobson CM (2003): Protein folding and misfolding. Nature 426, 884-890

Duchenne de Boulogne GB (1851): Recherches électrophysiologiques et thérapeutiques. Comp Rend Seances Acad Sci 32, 506-510

Dunham NW, Miya TS (1957): A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. J Am Pharm Assoc 46, 208-209

Durham HD, Roy J, Dong L, Figlewicz DA (1997): Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. J Neuropathol Exp Neurol 56, 523-530

Eig J: Luckiest Man: The life and death of Lou Gehrig. Simon & Schuster, New York 2005

Emery AE, Holloway S: Familial motor neuron diseases; in: Human Motor Neuron Diseases; hrsg. v. Rowland LP; Raven Press, New York 1982, 139-147

Graubner B: ICD-10-GM 2012 Systematisches Verzeichnis: Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme 10. Revision - German Modification, 1. Auflage; hrsg. v. Deutschen Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG); Deutscher Ärzteverlag, Köln 2011

Gurney ME (1994): Transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med 331, 1721-1722

Gurney ME (1997): The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. J Neurol Sci 152, S67-S73

Gurney ME, Fleck TJ, Himes CS, Hall ED (1998): Riluzole preserves motor function in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 50, 62-66

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

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

Hackam DG (2007): Translating animal research into clinical benefit. Brit Med J 334, 163-164

Hackam DG, Redelmeier DA (2006): Translation of research evidence from animals to humans. J Am Med Ass 296, 1731-1732

Hagemann K: Einfluss körperlicher Aktivität auf Beginn und Verlauf der Amyotrophen Lateralsklerose im transgenen SOD1-Mausmodell. Med. Diss. Göttingen 2006

Hayashi H, Kato S (1989): Total manifestations of amyotrophic lateral sclerosis. ALS in the totally locked-in state. J Neurol Sci 93, 19-35

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

Hirano A, Donnenfeld H, Sasaki S, Nakano I (1984): Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol 43, 461-470

Hudson AJ (1981): Amyotrophic lateral sclerosis and its association with dementia, parkinsonism and other neurological disorders: a review. Brain 104, 217-247

Jones BJ, Roberts DJ (1968): A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naïve mice. Naunyn-Schmiedeberg´s Arch Pharmacol 259, 211

Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F (2008): TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. Nat Gen 40, 572-574

Karl T, Pabst R, von Hörsten S (2003): Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. Exp Toxicol Pathol 55, 69-83

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, 335-344

Kleinknecht A: Effekt der antiaggregativen Substanz anle138b in experimentellen in vivo und in vitro-Modellen der Amyotrophen Lateralsklerose. Med. Diss. Göttingen (in Vorbereitung)[40]

Koerner DR (1952): Amyotrophic lateral sclerosis on Guam: a clinical study and review of the literature. Ann Intern Med 37, 1204-1220

Kollewe K, Andersen PM, Borasio GD, Hardiman, O, Leigh PN, Pradat PF, Silani V, Tomik B, Dengler R (2008): Klinische Leitlinien zur Behandlung der Amyotrophen Lateralsklerose: Evidenzbasierte Übersicht mit Therapieempfehlungen der Arbeitsgruppe der EALSC und der EFNS. Nervenheilkunde 4, 302-316

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

Körner S, Kollewe K, Ilsemann J, Müller-Heine A, Dengler R, Krampfl K, Petri S (2012): Prevalence and prognostic impact of comorbidities in amyotrophic lateral sclerosis. Eur J Neurol

Kruman II, Pedersen WA, Springer JE, Mattson MP (1999): ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. Exp Neurol 160, 28-39

Kurland LT, Mulder DW (1954): Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis: 1. Preliminary report on geographic distribution, with special reference to the Mariana Islands, including clinical and pathologic observations. Neurology 4, 355-378

Kurland LT, Mulder DW (1955): Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis: 2. Familial aggregations indicative of dominant inheritance. Neurology 5, 182-196

Kwiatkowski Jr. TJ, Bosco DA, LeClerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T (2009): Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. Science 323, 1205-1208

Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Powe L, Durrleman S, Delumeau JC, Meininger V and the ALS/Riluzole Study Group II (1996): A confirmatory dose-ranging study of riluzole in ALS. Neurology 47, 242-250

[40] Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers.

Lansbury PT, Lashuel HA (2006): A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. Nature 443, 774-779

Leichsenring A, Linnartz B, Zhu XR, Lübbert H, Stichel CC (2006): Ascending neuropathology in the CNS of a mutant SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res 1096, 180-195

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

Lomen-Hoerth C, Anderson T, Miller B (2002): The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. Neurology 59, 1077-1079

Ludolph AC: Amyotrophe Lateralsklerose (ALS); in: Klinische Neurologie, 2. Auflage; hrsg. v. Berlit P; Springer-Verlag, Heidelberg 2006, 541–550

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

McCord JM, Fridovich I (1969): Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 244, 6049-6055

McCord JM, Fridovich I (1988): Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). Free Rad Biol Med 5, 363-369

Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979): A method for the routine assessment of fore- and hindlimb Grip-Strength of rats and mice. Neurobehav Toxicol 1, 233-236

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

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

Neary D, Snowden JS, Mann DMA, Northen B, Goulding PJ, Macdermott N (1990): Frontal lobe dementia and motor neuron disease. J Neurol Neurosurg Psych 53, 23-32

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, 130-133

Ou SHI, Wu F, Harrich D, García-Martínez LF, Gaynor RB (1995): Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. J Virol 69, 3584-3596

Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, Macleod M, Mignini LE, Jayaram P, Khan KS (2007): Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. Brit Med J 334, 197-202

Price DL, Sisodia SS, Borchelt DR (1998): Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models. Science 282, 1079-1083

Price DL, Wong PC, Markowska AL, Lee MK, Thinakaren G, Cleveland DW, Sisodia SS, Borchelt DR (2000): The value of transgenic models for the study of neurodegenerative diseases. Ann N Y Acad Sci 920, 179-191

Rabbits TH, Forster A, Larson R, Nathan P (1993): Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t (12;16) in malignant liposarcoma. Nat Genet 4, 175-180

Rakhit R, Robertson J, Vande Velde C, Horne P, Ruth DM, Griffin J, Cleveland DW, Cashman NR, Chakrabartty A (2007): An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS. Nat Med 13, 754-759

Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown Jr. RH (1996): Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. Nat Genet 13, 43-47

Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L (2011): A hexanecleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linkes ALS-FTD. Neuron 72, 257-268

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

Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW (1992): Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med 326, 1464-1468

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

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

Rowland LP (2001): How amyotophic lateral sclerosis got its name: the clinical pathology genius of Jean-Martin Charcot. Arch Neurol 58, 512-515

Sasaki S, Iwata M (1996): Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurosci Let 204, 53-56

Schmalbach S, Dengler R, Petri S (2010): Diagnostik der Amyotrophen Lateralsklerose. J Neurol Neurochir Psychiatr 11, 1-5

Scott S, Kranz JE, Cole J, Linecum JM, Thompson K, Kelly N, Bostrom A, Theodoss J, Al-Nakhala BM, Vieira FG (2008): Design, power, and interpretation of studies in the standard murine model of ALS. Amyotroph Lateral Scler 9, 4-15

Shaw PJ (2005): Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. J Neurol Neurosurg Psych 76, 1046-1057

Shibata N (2001): Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. Neuropathology 21, 82–92

Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, Asayama K, Umahara T, Komori T, Ikemoto A (1993): Immunhistochemical demonstration of Cu/Zn superoxide dismutase in the spinal cord of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. Acta Histochem Cytochem 26, 619-622

Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, Sasaki S, Kato T, Matsumoto S, Shiozawa Z, Komori T, Ikemoto A, Umahara T (1994): Cu/Zn superoxide dismutase-like immunoreactivity in Lewy body-like inclusions of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Neurosci Let 179, 149-152

Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, Siddique T, Deng HX, Hung WY, Kato T, Asayama K (1996): Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmatic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. J Neuropathol Exp Neurol 55, 481-490

Shoesmith Berke SJ, Paulson HL (2003): Protein aggregation and the ubiquitin proteasome pathway: gaining the upper hand on neurodegeneration. Curr Opinion Gen Dev 13, 253-261

Smith JP, Hicks PS, Ortiz LR, Martinez MJ, Mandler RN (1995): Quantitative measurement of muscle strength in the mouse. J Neurosci Meth 62, 15-19

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

Soriani MH, Desnuelle C (2009): Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. Rev Neurol (Paris) 165, 627-640

Soto C (2001): Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. FEBS Lett 498, 204-207

Soto C (2003): Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. Nat Rev 4, 49-60

Soto C, Estrada LD (2008): Protein misfolding and neurodegeneration. Arch Neurol 65, 184-189

Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E (2008): TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Science 319, 1668-1672

Storch A, Ludolph AC (2003): Neuroprotektion: Mechanismen und klinische Therapiestrategien. Med Welt 54, 300-305

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

Van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O´Collins V, Macleod MR (2010): Can animal models of disease reliably inform human studies? PLOS Med 7, 1-8

Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P (2009): Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. Science 323, 1208-1211

Veldink JH, Bar PR, Joosten EA, Otten M, Wokke JH, van den Berg LH (2003): Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. Neuromusc Disord 13, 737-743

Voet D, Voet JG: Biochemistry. 4. Auflage; J. Wiley & Sons, Hoboken 2011

Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Cizewski Culotta V, 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, 933-941

Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, Miller TM, Baloh RH (2009): TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. Proc Natl Acad Sci 106, 18809-18814

Weishaupt JH, Bartels C, Pölking E, Dietrich J, Rohde G, Poeggeler B, Mertens N, Sperling S, Bohn M, Hüther G (2006): Reduced oxidative damage in ALS by high-dose entereal melatonin treatment. J Pineal Res 41, 313-323

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

Wijesekera LC, Leigh PN (2009): Amyotrophic lateral sclerosis. Orphanet J Rare Dis 4, 3 (ohne Seitenangaben)

Wils H, Kleinberger G, Janssens J, Pereson S, Joris G, Cuijt I, Smits V, Ceuterick-de Groote C, Van Brockhoven C, Kumar-Singh S (2010): TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. Proc Natl Acad Sci 107, 3858-3863

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

Worms PM (2001): The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. J Neurol Sci 191, 3-9

Wu CH, Fallini C, Ticozzi N, Keagle PJ, Sapp PC, Piotrowska K, Lowe P, Koppers M, McKenna-Yasek D, Baron DM (2012): Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. Natue 488, 499-504

Zhang B, Tu PH, Abtahian F, Trojanowski JQ, Lee VMY (1997): Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. J Cell Biol 139, 1307-1315

Zucker I, Beery AK (2010): Males still dominate animal studies. Nature 465, 690

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Jean-Martin Charcot 2

Abbildung 2: Diagnosestellung nach den El Escorial-Kriterien 8

Abbildung 3: Chemische Strukturformel von anle138b 23

Abbildung 4: ZNS-Wirkspiegel von anle138b nach oraler Verabreichung von Futter (mit 1mg anle138b/g Futter) über drei Tage 24

Abbildung 5: Versuchsraum mit Einzelkäfigen 29

Abbildung 6: Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsregler im Versuchsraum 29

Abbildung 7: Käfig mit Streu, Streusperre, Häuschen und Laufrad mit Sensor 30

Abbildung 8: Vorrichtung zur Futter- und Wasserversorgung im Käfig 31

Abbildung 9: Laufrad im Käfig 33

Abbildung 10: Schulwaage 34

Abbildung 11: Grip-Strength-Meter 35

Abbildung 12: Rotarod mit Mäusen 37

Abbildung 13: *hSOD1*-transgene Maus in Seitenlage 39

Abbildung 14: Boxplot der Anzahl der Läufe pro Woche der Gruppen im gesamten Untersuchungszeitraum 44

Abbildung 15: Mittelwertplot mit Standardabweichungen der Anzahl der Läufe der Gruppen im Wochenverlauf 45

Abbildung 16: Boxplot der Gesamtdistanzen pro Woche der Gruppen im gesamten Untersuchungszeitraum 46

Abbildung 17: Mittelwertplot mit Standardabweichungen der Gesamtdistanzen der Gruppen im Wochenverlauf 47

Abbildung 18: Mittelwertplot mit Standardabweichungen der Maximalgeschwindigkeiten der Gruppen im Wochenverlauf 49

Abbildung 19: Boxplot der Gesamtlaufzeiten pro Woche der Gruppen im gesamten Untersuchungszeitraum 50

Abbildung 20: Mittelwertplot mit Standardabweichungen der Gesamtlaufzeiten der Gruppen im Wochenverlauf 51

Abbildung 21: Mittelwertplot mit Standardabweichungen des Gewichts der Gruppen im Wochenverlauf 53

Abbildung 22: Boxplot der wöchentlichen Griffkraft der Gruppen im gesamten Untersuchungszeitraum 56

Abbildung 23: Mittelwertplot mit Standardabweichungen der Griffkraft der Gruppen im Wochenverlauf 57

Abbildung 24: Mittelwertplot mit Standardabweichungen der Rotarod-Zeiten der Gruppen im Wochenverlauf 59

Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve für den Beginn der Symptomatik bei den transgenen Mäusen 61

Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve für die Überlebenszeit der transgenen Mäuse .. 62

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Mäuse in vier Versuchsgruppen nach Genotyp und Futter 28

Tabelle 2: Zusammensetzung des Tierfutters..... 31

Tabelle 3: Vergleich der mittleren Anzahl der Läufe der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten..... 46

Tabelle 4: Vergleich der mittleren Gesamtdistanzen der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten..... 48

Tabelle 5: Vergleich der mittleren Maximalgeschwindigkeiten der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten 50

Tabelle 6: Vergleich der mittleren Gesamtlaufzeiten der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten..... 52

Tabelle 7: Vergleiche des mittleren Gewichts der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) sowie der Gruppen 3 und 4 (Wildtyp-Mäuse) im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten..... 55

Tabelle 8: Vergleich der mittleren Griffkraft der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten 58

Tabelle 9: Vergleich der mittleren Rotarod-Zeiten der Gruppen 1 und 2 (transgene Mäuse) im Wochenverlauf und zu ausgewählten Zeitpunkten..... 60

9 Anhang: Nicht verwendetes Material

Die Aufzeichnung der Laufleistung der Mäuse umfasste zusätzlich zu den Parametern Anzahl der Läufe pro Woche, wöchentlich zurückgelegte Gesamtdistanz, wöchentlich erreichte Maximalgeschwindigkeit und Gesamtlaufzeit pro Woche die durchschnittlich zurückgelegte Gesamtdistanz pro Woche, die durchschnittlich erreichte Geschwindigkeit pro Woche sowie die durchschnittliche Laufzeit pro Woche. Diese Parameter wurden jedoch nicht in die Auswertung einbezogen.

9.1 Durchschnittsdistanz

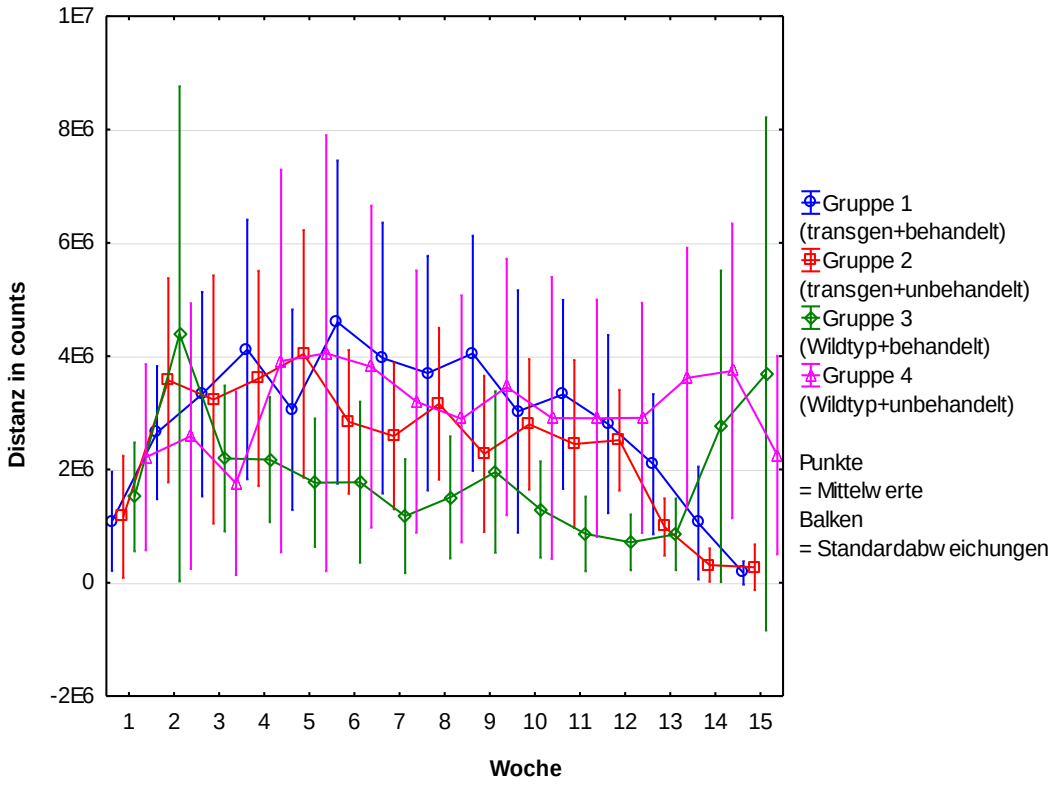


Abbildung: Mittelwertplot mit Standardabweichungen für die Durchschnittsdistanz der Gruppen im Wochenverlauf

9.2 Durchschnittsgeschwindigkeit

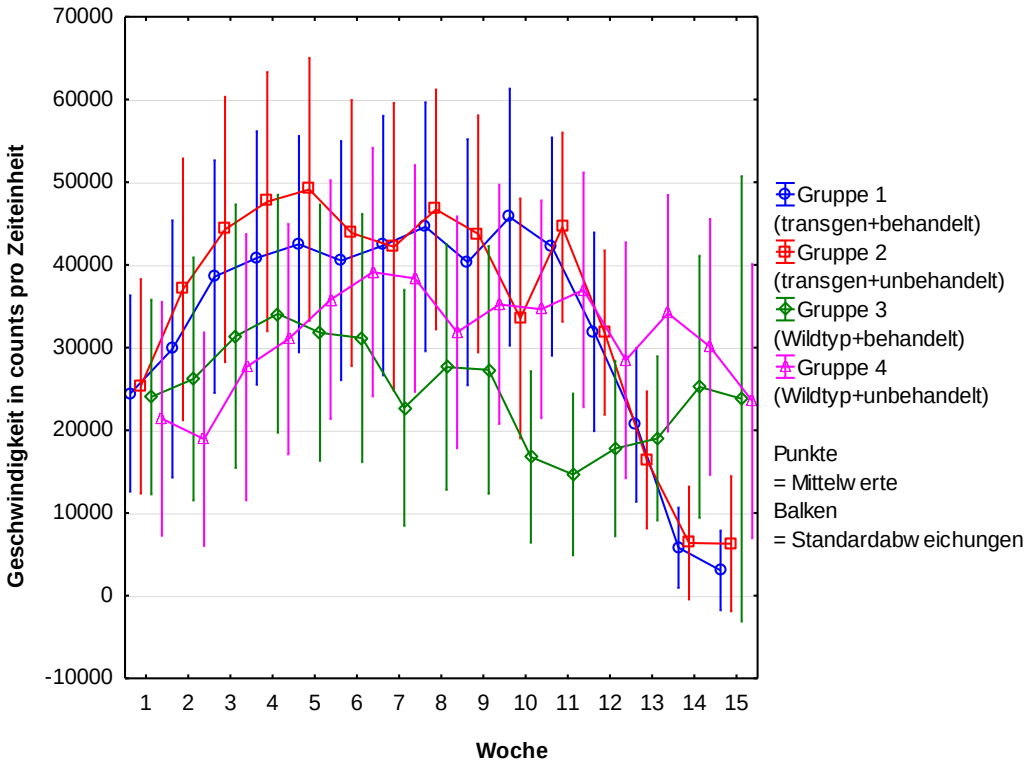
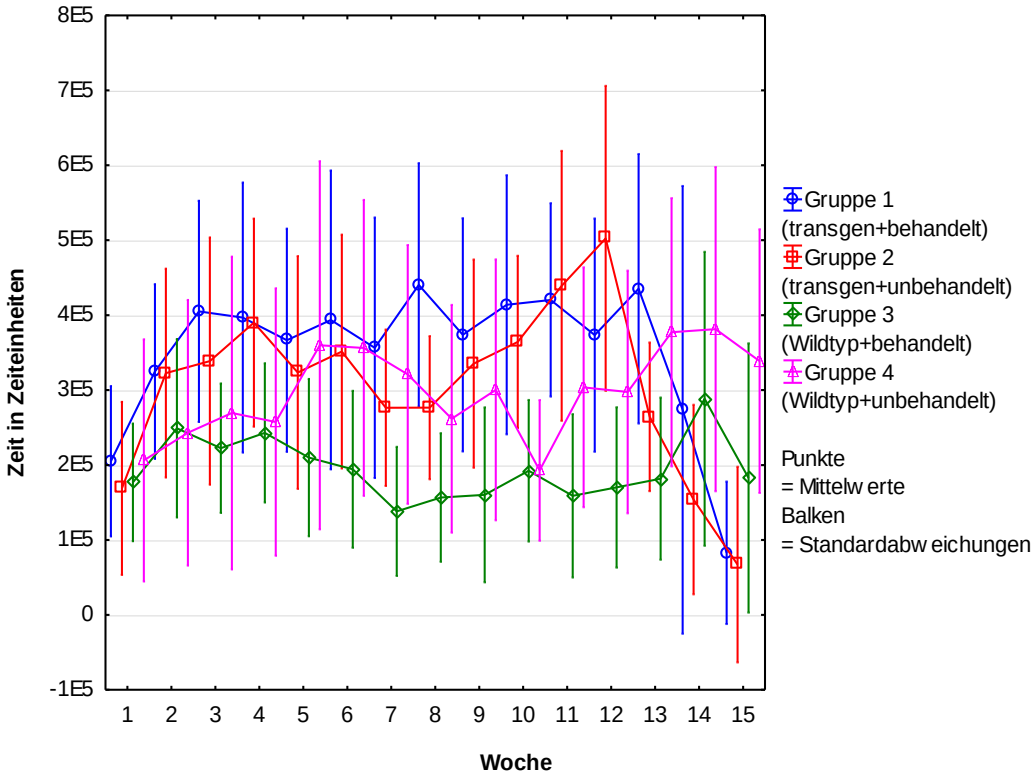


Abbildung: Mittelwertplot mit Standardabweichungen für die Durchschnittsgeschwindigkeit der Gruppen im Wochenverlauf

9.3 Durchschnittliche Laufzeit



<u>Abbildung</u>: Mittelwertplot mit Standardabweichungen für die durchschnittliche Laufzeit der Gruppen im Wochenverlauf

10 Publikation zum Thema der Dissertation

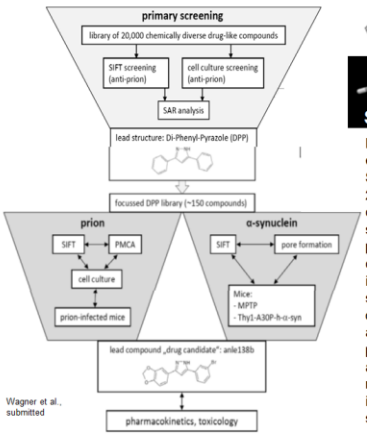
UNIVERSITÄTSMEDIZIN GÖTTINGEN UMG

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 α-synuclein models of neurodegeneration. We investigate if one of the drug candidates amongst the DPP derivatives, anle138b, is able to prevent pathological SOD1^{G93A} 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.



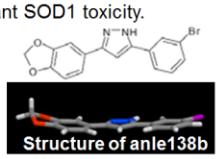


Fig.1: Summary of anle138b development. Starting from a library of 20,000 chemically diverse compounds, a DPP lead structure and finally the pharmacologically optimized compound anle138b was identified by high-throughput screening. Anle138b demonstrated strong anti-aggregative activity against prion protein and α-synuclein aggregation as well as neuroprotection in respective in vivo models (Wagner et al., submitted).

Conclusion

- Anle138b inhibits aggregation of mutant SOD1 in vitro and improves survival and motor performance in SOD1^{G93A} 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.
- Futher pre-clinical development of anle138b and a phase I study is warranted.

Methods

Animal experiments: For all experiments B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/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

Pharmakokinetics: 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 of), 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 seperated 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

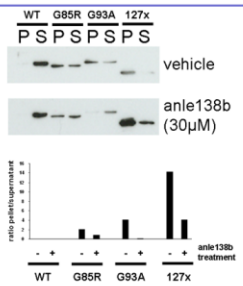


Fig. 2: Quantification of detergent insoluble protein aggregates in an ultracentrifugation asssay. HEK cells transfected with mSOD1 and WT SOD1 were treated with anle138b. The **ratio detergent insoluble pellet/soluble supernatant** is decreased by anle138b treatment, demonstrating enhanced solubility and less insoluble protein aggregate formation upon treatment.
Of note, increased steady state protein expression levels were consistently observed for the 127x SOD1 mutation in the treated condition, possibly resulting from decreased proteasomal degradation due to enhanced solubility of the truncated protein.
Purity of pellet and supernatant was confirmed by Histone H3 Western blot (data not shown).

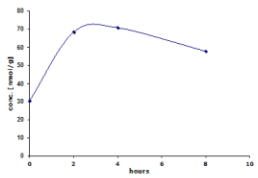


Fig. 3: Blood brain barrier penetration of anle138b in mice after oral application in food pellets for 3 days (HPLC measurements from using brain lysates). 0h is the begin of the active phase (lights off), when animals start taking up food. Animals had free access to food pellets containing anle138b throughout the timecourse of the experiment.

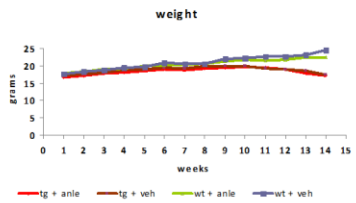


Fig. 4: Weight development of SOD1^{G93A} transgenic and WT mice treated with anle138b or vehicle. No difference in body weight is observed between treated and untreated animals neither in the transgenic nor in the WT groups.

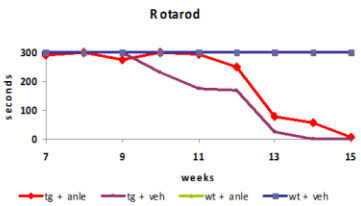


Fig. 5: Rotarod performance of SOD1^{G93A} transgenic and WT mice treated with anle138b or vehicle. Transgenic animals (tg) treated with anle138b show an impoved rota-rod perfomance compared to animals treated with vehicle only. There is no difference between untreated and treated WT animals, excluding unspecific effect of anle138b on overall motor activity.

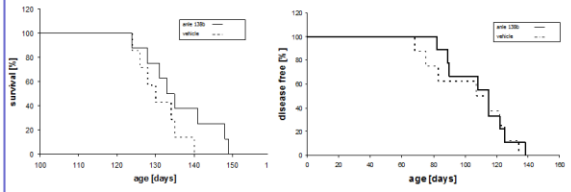


Fig. 6: Kaplan-Meier curves of SOD1^{G93A} transgenic mice treated with anle138b or vehicle. anle138b prolongs survival (left) but whilst disease onset is unaltered (right).

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bedanken bei

Prof. Dr. Jochen Weishaupt, der mir ermöglicht hat, diese Arbeit zu einem sehr interessanten Thema zu schreiben,

Prof. Dr. Mathias Bähr, für dessen Bereitschaft, diese mitzubetreuen,

Dr. Bettina Göricke und meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Christine Poser, ohne deren Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht zustande gekommen wäre,

Alexander Kleinknecht, meinem Kommilitonen, der den zweiten Teil dieser tierexperimentellen Studie erarbeitet hat,

der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Griesinger mit Sergey Ryazanov und Andrei Leonov am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, die durch die Entwicklung der in dieser Studie untersuchten Substanz anle138b den Anlass für diese tierexperimentelle Studie gab,

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen, die die Rahmenbedingungen für die Tierversuche geschaffen haben und mir zudem bei der Durchführung der Tierversuche behilflich waren,

Simon Schneider und den Mitarbeitern der Abteilung Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen, die mich bei der statistischen Auswertung der Versuchsdaten unterstützt haben,

meinem Vater Dr. Dr. Sieghard Thyssen sowie Kathrin Jakob für Denkanstöße und Korrekturen.

Lebenslauf

Am 4.April 1988 wurde ich in Hofgeismar als drittes von vier Kindern des Bibliotheksdirektors Dr. Dr. Sieghard Thyssen und der Gesamtschulrektorin Annelene Thyssen geboren. Ich habe zwei ältere Brüder und eine jüngere Schwester.

Von 1994 bis 1998 besuchte ich die Grundschule in Fuldatal-Simmershausen. Danach wechselte ich auf das Friedrichsgymnasium in Kassel, an dem ich 2007 die allgemeine Hochschulreife erlangte.

Zum Wintersemester 2007/2008 begann ich mit dem Humanmedizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen. Den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung schloss ich am 10.September 2009 ab.

Im Rahmen des Studiums absolvierte ich Pflegepraktika in der Pädiatrie sowie der Neurochirurgie des Klinikums Kassel und in der Neonatologie des Klinikums München-Schwabing. Famulaturen leistete ich in einer allgemeinmedizinisch-internistischen Gemeinschaftspraxis in Heiligenhaus/Rheinland, in der Anästhesie des Klinikums Wolfenbüttel, in der Neurologie des Universitätsklinikums Göttingen, in einer urologischen Gemeinschaftspraxis in Kassel, in der Kardiologie des Krankenhauses Neu-Betlehem in Göttingen und in der Unfallchirurgie des Klinikums Freising ab.

Während des Studiums arbeitete ich als studentische Hilfskraft in der Klinischen Chemie des Universitätsklinikums Göttingen, im Evangelischen Krankenhaus Göttingen-Weende sowie im Universitätsklinikum Göttingen.

Im Juli 2010 begann ich mit der Arbeit an meiner Dissertation.

Zurzeit befinde ich mich im Praktischen Jahr (11. und 12. Fachsemester). Dieses absolviere ich im Klinikum Bremen-Mitte (Wahlfach Pädiatrie), im Evangelischen Krankenhaus Göttingen-Weende (Chirurgie), im Concord Repatriation Hospital in Sydney/Australien (Chirurgie) sowie im St. Bernward Krankenhaus in Hildesheim (Innere Medizin).

Ende 2013 werde ich voraussichtlich mit dem zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der Georg-August-Universität Göttingen mein Medizinstudium abschließen.