

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

**Effekte der präsymptomatischen Applikation  
der Rho-Kinase-Inhibitoren Fasudil und Y-27632  
im SOD1(G93A)-Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose**

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

vorgelegt von

**Martin Erwin Hermann Suhr**

aus Bassum

Göttingen 2017

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

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. L. Tönges

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Februar 2017

Göttingen 2017

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	V
1 Einleitung .....	1
1.1 Amyotrophe Lateralsklerose .....	1
1.1.1 Einordnung der ALS in die Gruppe der motorischen Systemdegenerationen.....	1
1.1.2 Epidemiologie .....	1
1.1.3 Ätiopathogenese .....	2
1.1.4 Klinischer Verlauf der Erkrankung und Diagnosestellung .....	3
1.1.5 Therapie der ALS .....	4
1.2 Das SOD1-Mausmodell der ALS .....	5
1.2.2 Vergleich der verschiedenen SOD1-Mausmodelle.....	5
1.2.3 Krankheitsverlauf .....	6
1.2.4 Molekulare Pathomechanismen im SOD1-Mausmodell.....	6
1.3 Die Rho/ROCK-Signalkaskade und ROCK-Inhibition .....	10
1.3.1 RhoA und ROCK .....	10
1.3.2 ROCK als wichtiges Regulatormolekül verschiedener zellulärer Funktionen .....	11
1.3.3 Neuroregenerative Effekte der ROCK-Inhibition .....	12
1.3.4 Therapiepotenzial der ROCK-Inhibition .....	13
1.3.5 Vergleich der ROCK-Inhibitoren Fasudil (HA-1077) und Y-27632.....	14
1.3.6 Modulation überlebensfördernder Signalkaskaden durch Fasudil und Y-27632 .....	15
1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	16
2 Material und Methoden .....	17
2.1 Standardmaterialien .....	17
2.2 Studiendesign .....	19
2.3 Tierversuchsantrag.....	20
2.4 Zucht der SOD1-G93A-Mäuse und Tierhaltung.....	20
2.5 Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion .....	20
2.6 Messung der täglichen Trinkmenge einer Maus.....	22
2.7 Applikation der ROCK-Inhibitoren.....	22
2.8 Liquorpunktion bei der Maus und Nachweis von ROCK-Inhibitoren im <i>Liquor cerebrospinalis</i> .....	23
2.9 Verhaltensexperimente .....	24
2.9.1 Haltung der Versuchstiere.....	24
2.9.2 Versuchsabbruchs- und –ausschlusskriterien.....	25
2.9.3 Verhaltensexperimente zur motorischen Testung .....	26
2.10 Versuchsbeendigung und Gewebegewinnung .....	28
2.10.1 Anästhesie der Mäuse .....	28
2.10.2 Transkardiale Perfusion einer Maus .....	28

2.10.3 Rückenmarksentnahmetechnik bei der Maus.....	29
2.11 Immunhistochemie und quantitative Auswertungen .....	30
2.11.1 Anfertigen von Cryoschnitten.....	30
2.11.2 Immunhistochemische Färbungen .....	30
2.11.3 Quantifizierung der Motoneurone im Rückenmarksvorderhorn .....	32
2.12 Statistische Auswertungen .....	33
3 Ergebnisse.....	34
3.1 Tierzahlen in den einzelnen Kohorten .....	34
3.2 PCR mit anschließender Gelelektrophorese.....	34
3.3 Ergebnisse der Testung des <i>Liquor cerebrospinalis</i> nach Fasudilapplikation .....	35
3.4 Überlebensanalysen .....	36
3.4.1 Ergebnisse der Fasudilbehandlung der Weibchen .....	36
3.4.2 Ergebnisse der Fasudilbehandlung der Männchen .....	37
3.4.3 Ergebnisse der Y-27632 - Behandlung der Weibchen.....	38
3.4.4 Ergebnisse der Y-27632 - Behandlung der Männchen .....	39
3.5 Beginn klinischer Symptomatik .....	40
3.5.1 Ergebnisse der Fasudilbehandlung der Weibchen .....	40
3.5.2 Ergebnisse der Fasudilbehandlung der Männchen .....	41
3.5.3 Ergebnisse der Y-27632-Behandlung der Weibchen.....	42
3.5.4 Ergebnisse der Y-27632-Behandlung der Männchen .....	43
3.6 Verhaltensexperimente .....	44
3.6.1 Drehwalzentest ( <i>Rotarod</i> ).....	44
3.6.2 Gitterhängetest ( <i>Hanging wire</i> ).....	49
3.7 Immunhistochemie und Quantifizierung der Motoneuronanzahl.....	54
4 Diskussion .....	55
4.1 Präsymptomatische Behandlung mit Fasudil (30 mg/kgKG/d) verlängert das Überleben bei Weibchen.....	55
4.2 Einfluss der ROCK-Inhibition auf den klinischen Erkrankungsbeginn.....	56
4.3 Verbesserte Koordination durch Fasudil (30 mg/kgKG/d) bei den Weibchen.....	56
4.4 Mehr Motoneurone bei mit Fasudil (30 mg/kgKG/d) behandelten Weibchen.....	57
4.5 Translationale Forschung.....	58
4.6 Studienaufbau.....	59
4.7 Bedeutung nicht-neuronaler Zellen für Krankheitsentstehung und –progredienz der ALS ...	60
4.8 Wirkungen der ROCK-Inhibition auf die Vaskulatur.....	61
5 Zusammenfassung.....	62
6 Literaturverzeichnis.....	65
7 Internetquellen .....	78

## Abbildungsverzeichnis

Seitenzahl

Abbildung 1: Drehwalzengerät ( <i>Rotarod</i> ).....	26
Abbildung 2: Gitterhängetestvorrichtung ( <i>Hanging wire</i> ).....	27
Abbildung 3: Gelelektrophorese zur Genotypisierung.....	35
Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurve für die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Fasudilbehandlung (Weibchen) .....	37
Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve für die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Fasudilbehandlung (Männchen) .....	38
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve für die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Y-27632-Behandlung (Weibchen) .....	39
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve für die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Y-27632-Behandlung (Männchen) .....	40
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Fasudilbehandlung (Weibchen) .....	41
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Fasudilbehandlung (Männchen) .....	42
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Y-27632-Behandlung (Weibchen) .....	43
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Y-27632-Behandlung (Männchen) .....	44
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Rotarod</i> nach Fasudilbehandlung (Weibchen) .....	45
Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Rotarod</i> nach Fasudilbehandlung (Männchen) .....	46
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Rotarod</i> nach Y-27632-Behandlung (Weibchen) .....	47
Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Rotarod</i> nach Y-27632-Behandlung (Männchen).....	48
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Hanging-wire</i> -Versuch nach Fasudilbehandlung (Weibchen).....	49
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Hanging-wire</i> -Versuch nach Fasudilbehandlung (Männchen).....	51
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Hanging-wire</i> -Versuch nach Y-27632-Behandlung (Weibchen). .....	52
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Hanging-wire</i> -Versuch nach Y-27632-Behandlung (Männchen) .....	53
Abbildung 20: Anzahl von ChaT-positiven Zellen im Vorderhornbereich pro Cryoschnitt .....	54

<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>Seitenzahl</b>
Tabelle 1: Geräte.....	17
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....	18
Tabelle 3: Klinisches Bewertungsschema ( <i>clinical score</i> ).....	25
Tabelle 4: Tierversuchsschema .....	27
Tabelle 5: Versuchsgruppen.....	34
Tabelle 6: Mittelwerte und Verhältnisse der Liquormengen.....	36
Tabelle 7: Überlebenswahrscheinlichkeit nach Fasudilbehandlung (Weibchen) .....	37
Tabelle 8: Überlebenswahrscheinlichkeit nach Fasudilbehandlung (Männchen).....	38
Tabelle 9: Überlebenswahrscheinlichkeit nach Y-27632-Behandlung (Weibchen).....	39
Tabelle 10: Überlebenswahrscheinlichkeit nach Y-27632-Behandlung (Männchen) .....	40
Tabelle 11: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Fasudilbehandlung (Weibchen)	41
Tabelle 12: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Fasudilbehandlung (Männchen) .....	42
Tabelle 13: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Y27632-Behandlung (Weibchen) .....	43
Tabelle 14: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Y27632-Behandlung (Männchen) .....	44
Tabelle 15: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Rotarod</i> nach Fasudilbehandlung (Weibchen).....	45
Tabelle 16: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Rotarod</i> nach Fasudilbehandlung (Männchen).....	46
Tabelle 17: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Rotarod</i> nach Y-27632-Behandlung (Weibchen).....	47
Tabelle 18: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Rotarod</i> nach Y-27632-Behandlung (Männchen). .....	48
Tabelle 19: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Hanging-wire</i> -Versuch nach Fasudilbehandlung (Weibchen) .....	50
Tabelle 20: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Hanging-wire</i> -Versuch nach Fasudilbehandlung (Männchen) .....	51
Tabelle 21: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Hanging-wire</i> -Versuch nach Y- 27632-Behandlung (Weibchen). .....	52
Tabelle 22: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im <i>Hanging-wire</i> -Versuch nach Y- 27632-Behandlung (Männchen). .....	53

## Abkürzungsverzeichnis

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AR	<i>autosomal recessive</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	<i>Body Mass Index</i>
CaMKII	<i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase</i>
ChAT	<i>choline acetyltransferase</i>
CM	<i>cisterna magna</i>
CRD	<i>cystein rich domain</i>
CRMP-2	<i>collapsin response mediator protein-2</i>
DCTNI	<i>dynactin</i>
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMPK	<i>myotonic dystrophy kinase</i>
EAAT2	<i>exitatory amino acid transporter 2</i>
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMG	Elektromyographie
ENG	Elektroneurographie
eNOS	endotheliale NO-Synthase
f	<i>female</i> (weiblich)
F-Aktin	filamentöses Aktin
FALS	familiäre Amyotrophe Lateralsklerose
<i>Fasudil high</i>	100 mg/kgKG/d Fasudil
<i>Fasudil low</i>	30 mg/kgKG/d Fasudil
Fe	Eisen
FTD	<i>frontotemporal lobe dementia</i>
GDP	Guanosindiphosphat
HA-1077	Hexahydro-1-(isoquinoline-5-sulfonyl)-1H-1,4-diazepine
Hb	Hämoglobin
IPC	<i>insoluble proteine complexes</i>
JNK1 $\alpha$ 1	<i>c-Jun N-terminal kinase 1= mitogen activated protein kinase-8</i>
LMND	<i>lower motor neuron disease</i>
m	<i>male</i> (männlich)
MARCKS	<i>myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate</i>

MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MND	<i>motor neuron disease</i>
MP	<i>micropipette</i>
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MRT	Magnetresonanztomographie
MYPT1	<i>myosin phosphatase- targeting subunit 1</i>
mSOD1	mutierte Kupfer/Zink-Superoxiddismutase1
n	Anzahl
NDS	<i>normal dunkey serum</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
NMJ	<i>neuro-muscular junction</i>
OH-Fasudil	Hydroxyfasudil
OT	Oberflächentemperatur
PBP	Progressive Bulbärparalyse
PBS	<i>phosphate buffer solution</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PH	<i>pleckstrin homology</i>
RBD	<i>Rho-binding domain</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-Kinase
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SMA	Spinale Muskelatrophie
SAB	Subarachnoidalblutung
SALS	sporadische Amyotrophe Lateralsklerose
SETX	<i>senataxin</i>
SOD1	Kupfer/Zink-Superoxiddismutase1
SSP	Spastische Spinalparalyse
TBS	TrisBase solution
TDP-43	TAR-bindendes Protein von 43 kDa Größe
Tg	transgen
VAPB	<i>vesicle associated membrane protein</i>
wt	<i>wildtype</i>



# 1 Einleitung

## 1.1 Amyotrophe Lateralsklerose

### 1.1.1 Einordnung der ALS in die Gruppe der motorischen Systemdegenerationen

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine erstmals 1869 charakterisierte klinische Entität, die sich zunächst in fokalen Schädigungszeichen des 1. und 2. Motoneurons äußert, welche im Verlauf generalisieren und klassischerweise zirka 3-5 Jahre nach Diagnosestellung zum Tode führen (Charcot und Joffroy 1869). Bei dieser ohne erkennbare Krankheitsschübe verlaufenden Motoneuronerkrankung sind jedoch ebenso Erkrankungsdauern von weniger als einem Jahr bis zu mehr als 20 Jahren beschrieben (Sieb und Schrank 2009). Im englischsprachigen Raum wird die ALS häufig mit dem Terminus *motor neuron disease* (MND) gleichgesetzt. Weitere Synonyme für ALS sind Morbus Charcot (*Maladie de Charcot*) und insbesondere im amerikanischen Sprachraum *Lou-Gehrig's disease*. Hierbei bezieht sich Morbus Charcot auf den oben erwähnten Erstbeschreiber der ALS, den französischen Neurologen Jean-Martin Charcot (1825-1893) und *Lou-Gehrig's disease* auf einen berühmten, an ALS verstorbenen Baseballspieler (Cleveland und Rothstein 2001). Abgegrenzt wird die klassische ALS von anderen Motoneuronerkrankungen, bei denen im gesamten Krankheitsverlauf ausschließlich nur das erste oder nur das zweite Motoneuron betroffen ist (Oliveira und Pereira 2009). So sind bei der spastischen Spinalparalyse (SSP) und der primären Lateralsklerose (PLS) auch im Endstadium der Erkrankung ausschließlich Läsionszeichen des ersten Motoneurons zu finden. Die spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine Erkrankung, die ausschließlich das zweite Motoneuron befällt (Oliveira et al. 2009). Bei der ALS finden sich intrazytoplasmatische Proteinaggregate, sogenannte Bunina-Körperchen (*Bunina-bodies*). Die ALS wird daher neuropathologisch zusammen mit dem Morbus Huntington, dem Morbus Parkinson und dem Morbus Alzheimer zu den Aggregopathien gerechnet (Okamoto et al. 2008; Dohm et al. 2008).

### 1.1.2 Epidemiologie

Die ALS ist die beim Erwachsenen häufigste erworbene neuromuskuläre Erkrankung (Sieb und Schrank, 2009). Die jährliche Neuerkrankungsrate der europäischen Bevölkerung (18 Jahre und älter) lag in den Jahren 1998/99 bei 2,7 pro 100.000 Einwohner/innen. Hierbei wurde bei Männern mit einer Inzidenz von 3,1 - im Gegensatz zu Frauen mit einer Inzidenz von 2,2 pro 100.000 Einwohner/innen - ALS zirka 1-4 fach häufiger neu diagnostiziert (Ligriscino et al. 2010). In der

Altersaufschlüsselung zeigt sich in der zusammengenommenen Analyse sechs europäischer ALS-Register eine Zunahme der Inzidenz nach dem 40. Lebensjahr mit einem Neuerkrankungsmaximum im Alter von 70-74 Jahren für Männer (10,7 pro 100.000 Einwohner) und 65-69 Jahren für Frauen (7,0 pro 100.000 Einwohnerinnen) (Ligriscino et al. 2010). Sowohl die Inzidenz, die Bevorzugung des männlichen Geschlechts, als auch die Prävalenz von zirka 5 pro 100.000 Einwohner/innen sind in allen Industrienationen in vergleichbarer Größenordnung vorzufinden (Neundörfer 2002). Somit ist für die USA von einer Gesamterkrankungsrate von 25.000- 30.000 Patientinnen und Patienten und für Großbritannien von zirka 5.000-6.000 Patienten auszugehen (Talbot und Marsden 2008). In Deutschland liegt die Prävalenz der ALS ebenfalls bei zirka 5.000-6.000 Patientinnen und Patienten. Es finden sich einige Endemiegebiete von ALS-Sonderformen wie z.B. auf der Kii-Halbinsel in Japan, auf Guam, Tinian, Saipan, Rota und im Südwesten Neu-Guineas, wo der so genannte ALS-Parkinson-Demenz-Komplex mit Inzidenzen von bis zu 1.000 pro 100.000 Menschen auftritt (Armon und Kurland 1990; Arnold et al. 1953; Gajdusek 1963; Elizan et al. 1966). Zusätzlich fand eine Studie unter italienischen Fußballspielern ein 6,5fach erhöhtes Risiko, an ALS zu erkranken (Chio et al. 2005). Das ALS-Erkrankungsrisiko ist auch unter Golfkriegs-Veteranen erhöht (Horner et al. 2003).

### 1.1.3 Ätiopathogenese

Bei der ALS findet sich eine progrediente Degeneration der Betz'schen-Pyramidenzellen im motorischen Kortex sowie der motorischen Vorderhornzellen (Berlit 2011). Die Ursache für die selektive Degeneration von Motoneuronen bei der ALS ist trotz intensiver Forschungsbemühungen weitestgehend ungeklärt. Eine Vielzahl von möglichen Risikofaktoren, die von Virusinfektionen über die Exposition gegenüber Schwermetallen und Pestiziden bis hin zu exzessiver körperlicher Aktivität reichen, wurden in der Literatur diskutiert (Chio et al. 2005). Als wissenschaftlich belegte Risikofaktoren für die ALS gelten neben einer positiven Familienanamnese ein höheres Lebensalter, männliches Geschlecht und Nikotinabusus (Armon 2009; Gastl und Ludoph 2007). Neben der sporadisch auftretenden ALS (SALS), die zirka 90% der Erkrankungsfälle ausmacht, finden sich in zirka 10% der Fälle zumeist autosomal-dominant vererbte familiäre ALS-Formen (FALS), die auf unterschiedliche Genmutationen, beispielsweise im Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase-1 (SOD1)-Gen (ALS1), Alsin-Gen (ALS2), Senataxin-Gen (ALS4), *Vesicle associated membrane protein* (VAPB, ALS8), TAR-bindenden Protein von 43 kDa Größe (TDP-43)-Gen (ALS10) und Veränderungen im *Chromosome 9 Open Reading Frame 72* (C9ORF72) zurückzuführen sind (Berlit 2011; Cudkowicz et al. 1997, Hufschmidt et al. 2013).

Hierbei machen Mutationen im SOD1-Gen zirka 20% der familiären und 2% der sporadischen ALS-Fälle aus (Wijesekera und Leigh 2009). Studienergebnisse deuten darauf hin, dass auch in weiteren Fällen sporadischer ALS eine ähnliche Fehlfaltung des SOD1-Proteins stattfindet, wie sie auch bei der mSOD1-assoziierten familiären ALS zu finden ist. Dieses unterstreicht die Wichtigkeit der Erforschung der SOD1-Mutation für das Verständnis der ALS (Synofzik et al. 2010). Insgesamt wurden bis heute bereits mehr als 120 verschiedene Mutationen in dem für das SOD1 kodierenden Gen gefunden. (Rosen et al. 1993; Boillée et al. 2006a; Wijesekera und Leigh 2009). Für die Hypothesenbildung möglicher bei der ALS ablaufender ätiopathogenetischer Prozesse stellen neben Untersuchungen bei ALS-Patienten insbesondere auch Ergebnisse in ALS-Mausmodellen eine Grundlage dar. Hypothesen des selektiven Motoneuronzelltods bei der ALS bestehen u.a. in Glutamat-induzierter Exitotoxizität, oxidativem Stress, mitochondrialer Dysfunktion, Inflammation und axonaler Pathologie (Boillée et al. 2006b; Hufschmidt et al. 2013; Laferriere und Polymenidou 2015; Rothstein 2009).

#### **1.1.4 Klinischer Verlauf der Erkrankung und Diagnosestellung**

Die ALS bietet im klinischen Bild je nach primärem Symptommanifestationsort interindividuell unterschiedlich lokalisierte fokale Läsionszeichen. Anfangs können sich diese nur auf das erste oder nur auf das zweite Motoneuron beschränken. Im Verlauf generalisiert jedoch diese Motoneuronerkrankung, so dass sich schließlich Degenerationszeichen beider Motoneurone manifestieren (Neundörfer 2002). In einigen Fällen klassischer ALS bestehen im Rahmen einer Pseudobulbärparalyse bei den Patienten zusätzlich Symptome wie pathologisches Lachen oder Weinen. (Berlit 2011). Des Weiteren finden sich bei einigen ALS-Patienten Störungen der gastrointestinalen Motilität und der Temperaturregulation (Berlit 2011). Je nachdem, ob der Erstmanifestationsort der motorischen Symptome die Extremitäten- oder Schluckmuskulatur umfasst, wird zwischen einem spinalen und bulbären ALS-Verlauf unterschieden. Hierbei umschließt der bulbäre Typ in unterschiedlichen Studien 18-29 % der ALS-Fälle und ist mit einer rascheren Krankheitsprogredienz assoziiert (Tysnes et al. 1994; Guldenberg et al. 1994). Bei beiden Verlaufsformen ist das Bewusstsein der Patienten bis zuletzt kaum beeinträchtigt (Neundörfer 2002). Todesursache ist häufig die respiratorische Insuffizienz. Diese kann sowohl Folge der aufgrund des rapiden Muskelschwundes einsetzenden peripheren Atemlähmung als auch einer Pneumonie infolge einer Aspiration bei zunehmender Dysarthrie sein (Sieb und Schank 2009). Im klinischen Bild ist die familiäre ALS (FALS) nicht von der sporadischen zu unterscheiden (Neundörfer, 2002).

Die ALS ist eine Ausschlussdiagnose, für deren primäre Diagnostik neben der klinisch-neurologischen sowie klinisch-neuropsychologischen Befunderhebung insbesondere die Elektromyographie (EMG) und -neurographie (ENG), die Messung der Vitalkapazität, des *Body-Mass-Indexes* (BMI) und verschiedener Laborparameter nach den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie obligat sind (DGN 2015). Als Differentialdiagnosen zur ALS kommen je nach im Vordergrund stehender Symptomatik eine Vielzahl möglicher Erkrankungen in Betracht, die von entzündlichen Neuropathien (z.B. multifokale Neuropathie), Engpasssyndromen, bulbospinaler Muskelatrophie (Kennedy-Syndrom), postpoliomyelitischer progressiver Muskelatrophie und Einschlusskörpermyositis bis hin zu Pseudobulbärparalyse bei Hirnstammischämie und paraneoplastischen Syndromen reichen (Berlit 2011, Neundörfer 2002). Aufgrund der Schwere der Erkrankung und der schlechten Prognose ist das Wissen um ALS-Sonderformen mit günstigerem Verlauf für behandelnde Ärzte essentiell (DGN 2015). Zur differentialdiagnostischen Abklärung sind die kranielle und spinale Magnetresonanztomographie, die Muskelbiopsie und die Liquoruntersuchung indiziert (Berlit 2011). Eine genetische Testung ist in familiär gehäuften ALS-Fällen oder untypischen Verlaufsformen zu erwägen. Die El Escorial-Kriterien in revidierter Form stehen als wissenschaftliche Hilfsmittel zur Diagnosestellung zur Verfügung (Brooks et al. 2000). Sie ermöglichen die Unterteilung in mögliche, wahrscheinliche oder sichere ALS anhand der Ausbreitung der Schädigungszeichen des ersten und zweiten Motoneurons. Hierbei werden vier Regionen, nämlich bulbär, zervikal, thorakal und lumbosakral unterschieden. Je mehr Regionen betroffen sind, desto wahrscheinlicher ist die Diagnose ALS. Die Progredienz der Erkrankung ist ein weiteres wichtiges Kriterium für die Diagnosestellung (Brooks et al. 2000).

### **1.1.5 Therapie der ALS**

Trotz intensiver Forschungsbemühungen und des umfangreichen Wissens über die mSOD1-vermittelte ALS im Mausmodell existiert bis heute nur ein einziges, bisher spezifisch für die Behandlung der ALS zugelassenes Medikament. Dieses ist der NMDA-Antagonist Riluzol, welcher die mittlere Überlebenszeit der Patienten um zirka drei Monate verlängert (Bensimon et al. 1994, Mitsumoto et al. 2014) und ursprünglich aus einer tierexperimentellen Studie an ALS-Mäusen entwickelt wurde (Gurney et al. 1998). Die supportive Therapie mit dem Ziel der Symptomkontrolle steht mangels anderer kausaler Therapieoptionen im Vordergrund der ALS-Behandlung. Die Behandlung von Patienten mit ALS durch ein multiprofessionelles Team wird laut den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN)

empfohlen (DGN 2015). Hierbei sollen Logo-, Ergo- und Physiotherapie, die Betreuung durch einen Psychologen, einen Zahnarzt, einen Gastroenterologen und einen Pulmologen sowie die Unterstützung durch eine mit der ALS vertrauten Pflegekraft gewährleistet werden (DGN 2015). Als Beispiele supportiver Therapie bei der ALS sind die Gabe von Muskelrelaxantien bei vorhandener Spastik (z.B. Baclofen), das Behandeln einer möglichen Pseudobulbärparalyse und die Therapie der Verschleimung der Atemwege durch Mukolytika (z.B. Acetylcystein) zu nennen. Für weitere Informationen wird auf die aktuellen Therapieleitlinien der DGN verwiesen (DGN 2015). Das Ausweiten des Therapiespektrums insbesondere im Bereich der kausalen Therapieoptionen für die Behandlung der ALS muss wichtiges Ziel zukünftiger Forschungsbemühungen bleiben. Hierbei können insbesondere neuroprotektive Strategien mögliche Therapieoptionen sein.

## **1.2 Das SOD1-Mausmodell der ALS**

### **1.2.1 Superoxiddismutase 1**

Die Superoxiddismutase 1 (SOD1) ist ein ubiquitär exprimiertes Enzym und schützt die Zellen vor oxidativem Stress, indem es im normalen Zustand den Abbau von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid katalysiert (Berlit 2011, Pasinelli und Brown 2006). Infolge einer Mutation ist die Tertiärstruktur der SOD1 so verändert, dass sich zytoplasmatische Proteinaggregate ausbilden. Als eine Ursache der Krankheitsentstehung der ALS wird eine veränderte Funktion der mutierten Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase (mSOD1) angenommen (Sau et al. 2007).

### **1.2.2 Vergleich der verschiedenen SOD1-Mausmodelle**

Mit Übertragung verschiedener humaner SOD1-Mutationen auf das Mäusegenom stehen mittlerweile mehrere transgene Mausmodelle der ALS zur Verfügung, die neuropathologische sowie klinische Charakteristika einer selektiven Vorderhorndegeneration aufweisen. Sie unterscheiden sich in ihrer SOD1-Aktivität, dem beobachteten Krankheitsbeginn und der Erkrankungsdauer (Gurney et al. 1994, Turner und Talbot 2008). Das bis heute am besten charakterisierte ALS-Mausmodell ist das SOD1-(G93A)-Mausmodell. Bei diesem Tiermodell befindet sich die zur Motoneurondegeneration führende Punktmutation im 3. Exon des murinen Chromosoms 21 an Position 93 und besteht aus einer Substitution der Aminosäure Glycin zu Alanin (Gurney et al. 1994). Es gibt mehrere SOD1(G93A)-Mauslinien, wobei die SOD1-(G93A)-*high copy number* mit dem Hintergrund B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1 Gur/J bei

vielen Forschergruppen weltweit Verwendung findet. Diese Mauslinie trägt 25 humane SOD1(G93A)-Kopien, was aufgrund der Mutation eine 13-fache SOD1-Aktivität bewirkt (Turner und Talbot 2008). Bei der Interpretation und dem Vergleich der bisherigen präklinischen Studien sind die jeweils verwendeten ALS-Mausmodelle zu berücksichtigen, denn es treten je nach genutztem Mausmodell unterschiedliche Erkrankungsverläufe auf (Turner und Talbot 2008). Im folgenden Text ist unter dem Terminus SOD1-(G93A)-Mausmodell ausschließlich das oben beschriebene *high copy number*-Modell zu verstehen. Auf diese Mauslinie wird nun detaillierter eingegangen, da sie auch in unserer Studie Verwendung findet.

### **1.2.3 Krankheitsverlauf**

Der Krankheitsverlauf lässt sich sowohl bei ALS-Patienten als auch im ALS-Mausmodell in eine präsymptomatische und eine symptomatische Phase unterteilen. Hierbei beginnt die symptomatische Phase bei SOD1-(G93A)-Mäusen mit einer Schwankungsbreite von zirka 10 Tagen am 90. Lebenstag mit einem leichten Tremor einer hinteren Extremität beim Hochheben der Maus am Schwanz (Turner und Talbot 2008). Nach einer kurzen Latenz beginnt nach Erreichen des ersten Symptoms Tremor (zirka Tag 80) ein rapider Abfall der Leistung im Tretmühlentest (Rotarod). Die ALS-ähnliche Erkrankung der SOD1-(G93A)-Mäuse beginnt distal an den hinteren Extremitäten und breitet sich im Verlauf nach weiter proximal und auf die vorderen Extremitäten aus. Im klinischen Endstadium besteht eine Paralyse sowohl der Vorder- als auch Hinterextremitäten. Die Degeneration der Motoneuronaxone beginnt bereits in der präsymptomatischen Phase. Hierbei findet zunächst eine Denervation der motorischen Endplatte statt. Danach folgt eine Phase der axonalen Degeneration, bis ab zirka Tag 100 auch die Zellkörper der Motoneurone degenerieren und zugrunde gehen. Der Motoneuronverlust korreliert negativ sowohl mit der Anzahl der aktivierten Astrozyten als auch mit der Mikrogliaaktivierung. Auf molekularer Ebene bilden sich im Krankheitsverlauf unlösliche Proteinkomplexe. Die SOD1-(G93A)-Mäuse sterben meist nach 120-140 Tagen Lebenszeit (Turner und Talbot 2008).

### **1.2.4 Molekulare Pathomechanismen im SOD1-Mausmodell**

#### **1.2.4.1 Glutamat-induzierte Exitotoxizität**

Die Feststellung einer erhöhten Glutamatkonzentration im *Liquor cerebrospinalis* einiger ALS-Patienten durch Shaw und Mitarbeiter stellt eine Grundlage für die Entwicklung der Hypothese der Glutamat-induzierten Exitotoxizität für die Entstehung der ALS dar (Shaw et al. 1995). Im gleichen Jahr fand die Arbeitsgruppe um

Rothstein einen selektiven Verlust des glialen Glutamatransporters *excitatory amino acid transporter 2* (EAAT2) als mögliche Ursache einer gestörten Glutamat-homöostase bei der ALS (Rothstein 1995). Dieser Transporter ist im physiologischen Zustand für 90% der Glutamatwiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt der Motoneurone verantwortlich. Die durch den Verlust von EAAT2 erhöhten, innerhalb des synaptischen Spalts vorliegenden Glutamatkonzentrationen bewirken einen erhöhten postsynaptischen Kalziumeinstrom. Dieser ist insbesondere deshalb ein Stress für das Motoneuron, da spinale Motoneurone im Vergleich zu anderen Neuronen eine geringere Kalziumpufferkapazität aufweisen (Van den Bosch et al. 2006). Die Hypothese der Glutamat-induzierten Exitotoxizität wird durch die Wirksamkeit des präsynaptisch wirkenden N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Antagonisten Riluzol als bisher einzigem kausalem Therapieansatz bei der ALS bestärkt (Bensimon et al. 1994).

#### **1.2.4.2 Oxidativer Stress**

Die durch hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen begünstigte Entstehung freier Radikale führt zu vermehrtem oxidativen Stress des Motoneurons, wobei die so häufiger auftretenden toxischen Sauerstoffradikale u.a. die Desoxyribonukleinsäure (DNA), Mitochondrien und Strukturproteine weiterer Zellorganellen schädigen. Da die bei einigen FALS-Fällen mutierte SOD1 in ihrer Wildtypform ein antioxidatives Enzym ist, wurde zunächst der Hypothese einer *loss of function*-Mutation nachgegangen. Jedoch führte im Mausmodell die Ausschaltung der Wildtyp SOD1-Funktion nicht zur Entstehung von ALS, so dass es sich bei den mit mutierter SOD1 assoziierten ALS-Fällen wohl um eine noch nicht genau geklärte Enzymaktivitätsänderung handelt (Sau et al. 2007). Die Hypothese, dass ein oxidativer Schaden eine wichtige Rolle in der Progression der ALS spielt, wird durch den Fund erhöhter Spiegel von Oxidationsprodukten im ALS-Mausmodell untermauert (Andrus et al. 1998). Die Detoxifikation freier Sauerstoffradikale ist ein ATP-abhängiger Prozess und belastet den Energiehaushalt der ohnehin hoch stoffwechselaktiven Motoneurone zusätzlich. Durch die im Verlauf der ALS zunehmende mitochondriale Dysfunktion mit konsekutiv verringerter ATP-Synthese wird die energieabhängige Reduktion toxischer Sauerstoffradikale zunehmend eingeschränkt und die Motoneurondegeneration somit beschleunigt.

#### 1.2.4.3 Mitochondriale Dysfunktion

Die schon weit vor Symptombeginn einsetzende zunehmende Einschränkung der ATP-Synthese durch die Mitochondrien führt zu einem Energiedefizit der Motoneurone, welches neben der reduzierten Detoxifikationskapazität anfallender Stoffwechselprodukte die Beeinträchtigung vieler für das Überleben essentieller Zellvorgänge wie der Proteinbiosynthese und vermutlich auch des ATP-abhängigen axonalen Transportes der Motoneurone bewirkt (Jaarsma et al. 2000). Zusätzlich ist die Kalziumpufferkapazität der Mitochondrien bei ALS eingeschränkt. Als strukturelle Korrelate der funktionellen Einschränkungen gelten das früh beobachtbare Anschwellen und die im Verlauf zunehmende Vakuolisierung der Mitochondrien (Magrané und Manfredi 2009). Interessanterweise finden sich degenerierende Mitochondrien zunächst an der motorischen Endplatte. Auch wurde die normalerweise zytosolische mSOD1 im Intermembranraum der Mitochondrien gefunden (Higgins et al. 2003). Die aufgrund fortschreitender Mitochondrien-degeneration einsetzende Freisetzung von Cytochrom C bewirkt eine Caspasen-aktivierung und konsekutiv den Motoneuronzelltod (Kong und Xu 1998; Reyes et al. 2010).

#### 1.2.4.4 Axonale Pathologie

Quantitative Analysen von Fischer und Mitarbeiter ergaben, dass bei SOD1(G93A)-Mäusen bereits am 47. Lebenstag eine 40%ige Denervation der motorischen Endplatten vorlag, ohne dass Schädigungszeichen der an der ventralen Wurzel gelegenen Axonabschnitte noch der  $\alpha$ -Motoneuronsomata selbst bestanden. 60% der an Tag 47 noch gesunden Axonabschnitte waren hingegen am 80. Lebenstag zu Grunde gegangen, wobei auch hier immer noch kein Verlust von Zellsomata beobachtbar war (Fischer et al. 2004). Diese und ähnliche Funde weiterer Studien führten zur Hypothese des Vorliegens eines axonalen *dying back*-Phänomens bei der ALS, nach dessen Modellvorstellung die Degeneration der Motoneuronsomata der letzte konsekutive Schritt einer an der motorischen Endplatte beginnenden und von distal nach proximal fortschreitenden axonalen Degeneration ist (Fischer et al. 2004). Frey und Mitarbeiter stellen in diesem Zusammenhang insbesondere die Bedeutung der früh detektierbaren synaptischen Funktionseinschränkungen an der motorischen Endplatte als ein wichtiges initiales Erscheinungsmerkmal in der Ätiopathogenese im ALS-Mausmodell heraus (Frey et al. 2000), wobei synaptische Transmissionsdefizite auch im Biopsiematerial von



ALS-Patienten detektierbar sind und somit die *dying back*-Hypothese der ALS unterstützen (Maselli et al. 1993). Da Motoneurone im Vergleich zu anderen Neuronenpopulationen vergleichsweise lange Axone aufweisen und gerade auch an der motorischen Endplatte hoch stoffwechselaktiv sind, wirken sich die bereits in vorherigen Unterpunkten beschriebenen auftretenden axonalen Transportdefizite, die mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress insbesondere in weit vom Soma gelegenen Axonabschnitten zusätzlich negativ auf die synaptische und axonale Integrität aus (Pun et al. 2006). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist die Aussage, dass der alleinige Erhalt der Motoneuronsomata für die Behandlung der ALS wenig effektiv ist, nicht verwunderlich (Gould et al. 2006). Vielmehr könnten Axon stabilisierende und die synaptische Funktion der motorischen Endplatte erhaltende und somit in der Ätiopathogenese der ALS früher ansetzende Therapie-strategien Erfolg versprechend sein (Tönges et al. 2014, Williamson und Cleveland 1999).

Es wurde bisher sowohl ein anterograd als auch retrograd verlangsamter axonaler Transport im ALS-Mausmodell gefunden, der insbesondere auch den Neurofilament- und Mitochondrientransport mit einschließt (Bilsland et al. 2010). Hierbei wird diskutiert, ob die aufgrund der mSOD1 entstehenden Aggregate möglicherweise auch mechanisch die Transportprozesse behindern. Aufgrund der Länge der Motoneuron-axone wirkt sich ein axonales Transportdefizit im Vergleich zu anderen Neuronenpopulationen besonders negativ auf die allgemeine Funktionsfähigkeit der Motoneurone aus. Aufgrund der allgemein verminderten Transportkapazität kann insbesondere die dadurch gestörte Energie- und Stoffwechsellage weiter distal gelegener Axonabschnitte im zeitlichen Verlauf zu Schädigungen führen, als dieses bei näher am Zellsoma gelegenen Axonabschnitten der Fall ist (Kong und Xu 1998). Ein weiterer Fund ist, dass bei den Astrozyten, die ebenfalls mSOD1 exprimieren, die Glutamataufnahmekapazität der Astrozyten aus dem synaptischen Spalt aufgrund der verminderten Anzahl von EAAT2 verringert ist, so dass Glutamat verlängert im synaptischen Spalt verbleibt. Aus dem vermehrten Binden von Glutamat an NMDA und AMPA-Rezeptoren an der Motoneuronmembran resultiert ein erhöhter intrazytoplasmatischer Kalziumspiegel im Motoneuron, welcher ein Stressfaktor für das Motoneuron darstellt. Es wird angenommen, dass mSOD1 einen veränderten DNA/Ribonukleinsäure(RNA)-Metabolismus, einen verlangsamten axonalen und veränderten Vesikeltransport sowie Proteasomen-, Mitochondrien- und endoplasmatisches Retikulum-Stress bewirkt, der über Caspasenaktivierung letztlich zum Motoneuronsterben führt (Pasinelli und Brown 2006).

## 1.3 Die Rho/ROCK-Signalkaskade und ROCK-Inhibition

### 1.3.1 RhoA und ROCK

RhoA ist eine kleine Guanosintriphosphat(GTP)ase von 24 kDa und gehört neben Rac1 und Cdc42 zur Rho-Familie kleiner GTPasen, die selbst ein Teil der Ras-Superfamilie ist. So spielt RhoA eine übergeordnete Rolle insbesondere in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts, welches bei dynamischen Prozessen wie der Zell-Zell-Adhäsion, Zell-Matrix-Adhäsion und Migration von besonderer Relevanz ist (Hall 1998). Als weitere wichtige Funktionen sind die Mikrotubuli- sowie Intermediärfilamentregulation zu nennen, die wie auch das Aktin-Zytoskelett maßgeblich durch die Rho/ROCK-Signalkaskade beeinflusst werden und deren Dynamik beispielsweise für axonale Transportprozesse wichtig ist (Amano et al. 2010). RhoA ist inaktiv wenn es Guanosindiphosphat(GDP)-gebunden vorliegt und besitzt in seiner aktiven GTP-gebundenen Form eine Reihe direkter Effektoren wie beispielsweise die Proteinkinase N, Citronkinase oder Rhotekin, wobei die Rho-kinasen (ROCK) eine der am meisten untersuchten Effektoren der RhoA darstellen (Amano et al. 2010). Es gibt zwei Rho-Kinase (ROCK)-Isoformen, ROCK I (auch: ROK beta) und ROCK II (auch: ROK alpha), die beide zur Gruppe der Serin/Threonin-Protein-Kinasen zählen und deren Aminosäuresequenz insgesamt zu 65% und in der Kinasedomäne je nach Literatur sogar zu zirka 83-92% identisch ist (Amano et al. 2010; Nakagawa et al. 1996). Zu anderen Kinasen, die Einfluss auf das Aktinzytoskelett haben, wie die Citronkinase oder *Myotonic dystrophy kinase* (DMPK), besteht eine 45- 50% Homologie.

Beide Rho-kinasen sind aus einer katalytischen Domäne am N-Terminus, einem zentralen coiled-coil Abschnitt, das auch die Rho-Bindungsstelle beinhaltet und einer Pleckstrin homologen Domäne am C-Terminus aufgebaut, wobei sich in letzterer eine Cystein-reiche Region befindet (Matsui et al. 1996; Liao et al. 2007; Amano et al. 2010). Des Weiteren bestehen am N- und C-Terminus der Kinasedomäne Extensionen, die eine intramolekulare *head-to-head* Homodimer-Struktur ausbilden. Der C-Terminus der Rho-kinase hat zudem eine auto-inhibitorische Funktion auf die Kinaseaktivität (Amano et al. 1999). Während ROCK I nahezu ubiquitär vorkommt, finden sich erhöhte ROCK II-Mengen vor allem in Gehirn- und Muskelgewebe (Leung et al. 1996; Nakagawa et al. 1996).

### 1.3.2 ROCK als wichtiges Regulatormolekül verschiedener zellulärer Funktionen

ROCK wird nach RhoA(GTP)-Bindung aktiviert und phosphoryliert im aktiven Zustand zahlreiche Zielproteine, die je nach ihren eigenen Effektor-Kaskaden in Aktin-bindende/regulierende, Mikrotubuli-bindende/regulierende, intermediär-Filament-beeinflussende und andere eingeteilt werden können (Tönges et al. 2006). Wichtig ist diesem Zusammenhang die ausschließlich von ROCK II auf zweifachem Wege stattfindende Beeinflussung der *Myosin light chain*-Phosphatase Aktivität, zum einen durch direkte Phosphorylierung ihrer *Myosin phosphatase-targeting subunit 1*-Untereinheit, zum anderen durch Phosphorylierung und damit Aktivierung des MLC Phosphatase-Inhibitors CPI-17 (Amano et al. 2010). Hierdurch dephosphoryliert die MLC Ezrin/Radixin/Moesin, Adducin und *microtubuli associated protein-2*/Tau. Dieses führt konsekutiv zu einem höheren Anteil der ROCK-abhängig phosphorylierten Form dieser Moleküle. Der Effekt der Phosphorylierung von MLC ist eine Aktivierung der MyosinATPase. Eine vermehrte Phosphorylierung von Adducin bewirkt eine verstärkte F-Aktin Bindung (Fukata et al. 1999). Die Aktivierung der Rho/ROCK-Kaskade beeinflusst hierdurch die Aktinzytoskelettdynamik und führt bei Fibroblasten zu Zellkontraktion. In diesem modulatorischen Prozess ist die Phosphorylierung von LIM-Kinase I und II durch ROCK wichtig, da LIMK Cofilin mittels Phosphorylierung inaktiviert, woraus eine verstärkte Depolymerisation von Aktin und zunehmende Aktin/Myosin-Interaktion resultiert (Maekawa et al. 1999; Müller et al. 2005). Phosphorylierung von MAP-2 und Tau verringert die Mikrotubulipolymerisation (Schmandke et al. 2007). Hervorzuheben ist, dass phosphoryliertes *collapsin response mediator protein 2* (CRMP-2) einen Kollaps des neuronalen Wachstumskegels bewirkt und somit die Regenerationsfähigkeit des ZNS beschränkt (Goshima et al. 1995; Arimura et al. 2000). Eine Aktivierung der Rho/ROCK-Kaskade ist beispielsweise infolge einer Rückenmarksverletzung und im Rahmen des Morbus Alzheimer zu beobachten (Amano et al. 2010). Aber auch bei weiteren pathophysiologischen Vorgängen wie Vasospasmus und Hypertension ist die Aktivierung der Rho/ROCK-Kaskade nicht zuletzt durch konsekutive Phosphorylierung und damit Inaktivierung der endothelialen NO-Synthase sowie durch ROCK-Effektoren entstehende vermehrte Aktin-Myosin-Interaktion innerhalb der glatten Gefäßmuskulatur beteiligt, die zu einer Kontraktion der *Tunica muscularis* insbesondere der Arteriolen führt und damit zur Pathogenese dieser Erkrankungen beiträgt. Dass das weite Spektrum der Bedeutung der Rho/ROCK-Kaskade und ihrer multiplen Funktion innerhalb essentieller Zellvorgänge noch nicht vollständig aufgeklärt ist, beweist eine Studie von Amano und Mitarbeitern aus dem Jahr 2010, die mehr als 100 potenzielle

weitere Substrate der Rho-kinasen unter anderem AP180, APP und Doublecortin mittels einer Interaktom-Analyse identifizieren konnten (Amano et al. 2010).

Infolge von axonalen Läsionen im spinalen Traumamodell der Ratte ist die durch RhoA/ROCK vermittelte Signalkaskade in Nervenzellen verstärkt aktiviert und bewirkt einen Kollaps des axonalen Wachstumskegels (Jalink et al. 1994; Katoh et al. 1998; Müller et al. 2005). Ein wichtiger Mechanismus, der zu einer verstärkten intraneuronalen RhoA-Aktivierung und damit zur ROCK abhängigen Phosphorylierung der bereits beschriebenen multiplen Effektormoleküle führt, ist die Aktivierung des axonalen Nogo 66-Rezeptors. Dieser membranständige Signaltransduktor wird unter anderem durch die aufgrund einer Myelinscheidenschädigung vermehrt extrazellulär vorliegenden Myelin-assoziierten Proteine Nogo-A, *oligodendrocyte-myelin glycoprotein* und *Myelin-associated glycoprotein* aktiviert (Fournier et al. 2003; Domeniconi et al. 2002; Wang et al. 2002). Die überschießende Rho/ROCK-Aktivierung bewirkt allgemein eine Abnahme neuronaler Umbau- und Transportprozesse, da auch hierfür eine ausreichende Zytoskelettdynamik essenziell ist. Die vermehrte Kontraktilität des Zytoskelettes ist eine mögliche Ursache für die eingeschränkte Regenerationsfähigkeit des ZNS (Olsen et al. 2008). Die Applikation von ROCK-Inhibitoren bietet hierbei einen viel versprechenden therapeutischen Ansatz für neurologische Erkrankungen, da hierdurch die für neuronale Funktion und Regeneration wichtige Dynamik des Wachstumskegels und der Neuritenfortsätze sowie zusätzlich eine axonale Stabilisierung verbessert werden könnten (Müller et al. 2005; Tönges et al. 2006).

### **1.3.3 Neuroregenerative Effekte der ROCK-Inhibition**

Die pharmakologischen ROCK-Inhibitoren Fasudil und Y-27632 sind bis dato in Tiermodellen unterschiedlicher Krankheitsentitäten, wie beispielsweise bronchialem Asthma, pulmonaler Hypertension, Glaukom- und Nierenerkrankungen sowie Karzinomen, erfolgreich getestet worden (Honjo et al. 2001; Nagatoya et al. 2002; Hu und Lee 2003). ROCK-Inhibitoren spielen auch in der kardiovaskulären Forschung eine wichtige Rolle (Shimokawa und Takeshita 2005). In Japan wird Fasudil bereits seit 1995 erfolgreich in der Therapie von Vasospasmen nach Subarachnoidalblutung beim Menschen eingesetzt (Shibuya et al. 2005). In Tiermodellen neurologischer Erkrankungen, beispielsweise traumatischer Rückenmarks- und Sehnervenschädigungen, konnten ROCK-Inhibitoren regenerationsfördernde Effekte erzielen (Kubo et al. 2008, Müller et al. 2005). Zusätzlich wurde Fasudil aufgrund seiner anti-A $\beta$ 42-Komponente in einem Modell des Morbus Alzheimer getestet (Song et al. 2013). Auch in der präklinischen Schlaganfallforschung werden ROCK-Inhibitoren getestet

und zeigen protektive Effekte (Huang et al. 2009). In einem Mausmodell der Parkinsonerkrankung konnten mittels ROCK-Inhibition progenerative Effekte erzielt werden (Tönges et al. 2012). In einem Modell der Läsion peripherer Nerven zeigte sich ebenfalls ein neuroregenerativer Effekt durch ROCK-Inhibition (Hiraga et al. 2006). In Versuchen am Sehnerv der Ratte konnten Lingor und Mitarbeiter zeigen, dass ROCK-Inhibition durch Y-27632 nicht nur zu verstärkter Regeneration retinaler Ganglienzellen *in vivo* und *in vitro* führt, sondern auch neuroprotektive Eigenschaften besitzt, die durch eine begünstigende Förderung überlebensfördernder intrazellulärer Signale erklärt werden kann (Lingor et al. 2008). Sowohl Studienergebnisse von Ichikawa und Mitarbeiter an retinalen Ganglienzellen der Katze, als auch von Lingor und Mitarbeiter legen nahe, dass Y-27632 das Neuritenwachstum zusätzlich auch über bisher unbekannte Signaltransduktionswege das Neuritenwachstum positiv beeinflusst (Ichikawa et al. 2008). Die Ergebnisse, dass sowohl Fasudil als auch Y-27632 neuronale Regeneration dosisabhängig verstärken, wurden durch weitere Untersuchungsergebnisse bestätigt (Lingor et al. 2007).

#### **1.3.4 Therapiepotenzial der ROCK-Inhibition**

Mehrere Studien belegen die therapeutische Potenz der ROCK-Inhibition in unterschiedlichen Mausmodellen neurologischer Erkrankungen. So vermochte beispielsweise die orale Applikation von 100 mg/kgKG/d Y-27632 die mittels Rotarod gemessene motorische Leistungsfähigkeit im R6/2-Mausmodell des Morbus Huntington im Vergleich zur Kontrolle signifikant zu verbessern (Li et al. 2009). Jedoch bewirkte die ROCK-Inhibition in dieser Studie keinen Überlebensvorteil und auch keine Veränderung des Körpergewichts. In einem Mausmodell spinaler Muskelatrophie mittelgradiger Ausprägung konnte jedoch durch eine Applikation von 30 mg/kgKG/d Y-27632 sowohl die Überlebenszeit als auch das Körpergewicht der Smn 2B/+ und das Überleben der Smn2B/- Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbessert werden. Dieses stellt den größten Überlebensvorteil dar, der je mittels pharmakologischer Intervention in einem SMA-Mausmodell erzielt werden konnte (Bowerman et al. 2010). Im Mausmodell experimenteller Autoimmunenkephalitis (EAE) der Multiplen Sklerose konnte eine intraperitoneale Gabe von 50 mg/kgKG/d Fasudil, die vom 5.-16. Lebenstag durchgeführt wurde, das Auftreten und die Schwere der EAE signifikant verringern (Yu et al. 2010). Diesen Effekt führen die Autoren maßgeblich auf die immunmodulatorische Komponente der ROCK-Inhibition zurück. Es konnte gezeigt werden, dass aufgrund der Fasudilapplikation weniger T-Zellen ins zentrale Nervensystem des EAE-Mausmodells einwandern (Yu et al. 2010). Dass die Applikation von ROCK-Inhibitoren sowohl das Überleben als auch

die motorische Leistungsfähigkeit und in verschiedenen Mausmodellen neurologischer Erkrankungen positiv beeinflussen kann, ist ein weiteres wichtiges Indiz für einen eventuellen positiven Effekt von ROCK-Inhibition im ALS-Mausmodell. Durch Applikation von ROCK-Inhibitoren konnten sowohl das Neuritenausprossen als auch das -wachstum unterschiedlicher Neuronenpopulationen gefördert werden kann (Lingor et al. 2007; Minase et al. 2010; Yang et al. 2010). Duffy und Mitarbeiter zeigen, dass unter anderem ROCK II-Genprodukte einen Grund für die verminderte Axonaussprossungskraft nach Läsion im adulten ZNS darstellen (Duffy et al. 2009). ROCK-Inhibition könnte für viele neurologische Erkrankungen eine mögliche therapeutische Interventionsmöglichkeit darstellen, wobei Wu und Mitarbeiter durch Modulation der ROCK-Aktivität ein verstärktes axonales Auswachsen und eine teilweise klinische Regeneration in einem Modell der Rückenmarksverletzung beschreiben (Wu et al. 2009, Müller et al. 2005). Der momentane wissenschaftliche Kenntnisstand legt einen positiven Effekt der ROCK-Inhibition auch im ALS-Mausmodell nahe (Günther et al. 2014, Tönges et al. 2014).

### 1.3.5 Vergleich der ROCK-Inhibitoren Fasudil (HA-1077) und Y-27632

Sowohl *Hexahydro-1-(isoquinoline-5-sulfonyl)-1H-1,4-diazepine* (HA-1077 = Fasudil) als auch *[(+)-DANN-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl) cyclohexanecarboxamide dihydrochloride]* (Y-27632) inhibieren mit unterschiedlicher Selektivität verschiedene Proteinkinasen, insbesondere aber ROCK I und II, indem sie mit ATP um dessen Bindungsstelle im ROCK-Molekül konkurrieren (Jakobs et al. 2006). Die benötigte Konzentration um 50% der ROCK-II-Aktivität in vitro zu hemmen (IC<sub>50</sub>) beträgt für Y-27632 0,8 µM und für Fasudil (HA-1077) 1,9 µM. Somit ist Y-27632 bei gleicher Konzentration ein zwei- bis dreimal so starker ROCK-Inhibitor wie Fasudil (Davies et al. 2000). Rikitake und Mitarbeiter fanden für Fasudil eine IC<sub>50</sub> für ROCK I von 1,2 µM und für ROCK II 0,82 µM und für seinen Metaboliten Hydroxyfasudil eine IC<sub>50</sub> für ROCK I von 0,73 µM und ROCK II 0,72 µM (Rikitake et al. 2005), wobei auch Y27632 in seiner ROCK-Inhibition unselektiv ist. Weitere von Fasudil (Hydroxyfasudil) und Y-27632 inhibierte Proteinkinasen sind beispielsweise *mitogen- and stress-activated protein kinase-1*, MAPKAP-K1b (*Ribosomal S6 kinase = Rsk-2*), Proteinase A und C. Generell ist jedoch die ROCK-Inhibition durch Y-27632 im Vergleich zu Fasudil spezifischer (Davies et al. 2000), wobei selbst bei Fasudil eine IC<sub>50</sub> für andere Proteinkinasen von größer als 100 µmol/l gefunden wird (Rikitake et al. 2005). Ergebnisse von Lingor und Mitarbeitern legen nahe, dass Fasudil in Bezug auf die Regeneration ein deutlich kleineres therapeutisches Fenster als Y-27632 besitzt (Lingor et al. 2007).

### 1.3.6 Modulation überlebensfördernder Signalkaskaden durch Fasudil und Y-27632

Neben der regenerationsfördernden Funktion konnte gezeigt werden, dass Fasudil zusätzliche Wirkung auf weitere Signalwege und damit beispielsweise auf intrazelluläre Ionenkonzentrationen hat, die insbesondere auch in der Ätiopathogenese der ALS von Bedeutung sind. So konnten Yamashita und Mitarbeiter zeigen, dass die ROCK-Kaskade infolge von Ischämie insbesondere in Axonen hochreguliert ist und eine Applikation von Fasudil Glutamat-vermittelten Zelltod verringern kann (Yamashita et al. 2007). Ein in diesem Zusammenhang wichtiger durch Fasudil vermittelter neuroprotektiver Mechanismus ist die Verminderung der Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern (Huang et al. 2009). Aufgrund der bei Motoneuronen bestehenden geringen Kalziumpufferkapazität ist dieser kalziumantagonistische Effekt des Fasudils auch für eine mögliche Behandlung der ALS interessant. Zusätzlich vermögen Fasudil und Y-27632 einer zerebralen Minderperfusion durch Verhinderung der Herunterregulierung der eNOS zumindest partiell entgegenzuwirken, woraus ein konsekutiv gesteigerter regionaler Blutfluss resultiert (Rikitake et al. 2005). Fasudil wirkt zudem im Schlaganfallmodell antiinflammatorisch, indem es die Einwanderung neurophiler Granulozyten ins infarzierte Gewebe verringert (Satoh et al. 1999). Fasudil wirkt nicht nur direkt auf intraneuronale Kalziumspeicher und die Vaskulatur, sondern auch auf Mikrogliazellen und Astrozyten. So konnten Ding und Mitarbeiter zeigen, dass Fasudil die mikrogliale Ausschüttung der proinflammatorischen Faktoren Interleukin1 $\beta$ , Interleukin 6, *tumor necrosis factor* und Stickstoffmonoxid reduzieren und zusätzlich die Konzentrationen des antiinflammatorischen Faktors Interleukin 10 steigern kann (Ding et al. 2009). Neben der antiinflammatorischen Komponente wirkt Fasudil auch neuroprotektiv, indem es eine astrozytäre Ausschüttung des Wachstumsfaktors *granulocyte colony stimulating factors* bewirkt (Ding et al. 2009). Der krankheitsfördernde Einfluss mSOD1-tragender nicht-neuronaler Zellen bei der ALS könnte somit mittels ROCK-Inhibition möglicherweise abgeschwächt, beziehungsweise durch überlebensfördernde und antiinflammatorische gliale Prozesse partiell kompensiert werden (Boilleé et al. 2006a; Tönges et al. 2006).

#### 1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Aufgrund der multiplen günstigen Effekte der ROCK-Inhibitoren Fasudil und Y-27632 in verschiedenen Erkrankungsmodellen sowohl aus dem neurologischen als auch aus dem internistisch-vaskulären Bereich gibt es mehrere Argumente für die Testung von ROCK-Inhibitoren im ALS-Mausmodell. So konnten durch systemische ROCK-Inhibitorapplikation überlebensfördernde Mechanismen verstärkt werden. Das Wissen um die unterschiedlichen im Rahmen der Pathogenese der ALS auftretenden pathophysiologischen Veränderungen mit besonderer Bedeutung der Inflammation, der axonalen Pathologie und der vaskulären Veränderungen lässt die Untersuchung der Wirksamkeit von Fasudil und Y-27632 bei dieser Erkrankung sinnvoll erscheinen. Hierbei könnten Fasudil und Y-27632 möglicherweise die von Miyazaki und Mitarbeiter beschriebene intrinsische Regenerationskapazität der Rückenmarksmoto-neurone im ALS-Mausmodell stärken (Miyazaki et al. 2009) und die für die motorische Leistungsfähigkeit wichtige axonale Funktionsfähigkeit möglichst lange erhalten.

Konkretes Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob und inwieweit die systemische präsymptomatische Applikation der ROCK-Inhibitoren Fasudil (30 mg/kg/KG/d und 100 mg/kgKG/d) und Y-27632 (2 mg/kgKG/d) das Überleben im SOD1-(G93A)-Mausmodell im Vergleich zur nur mit Wasser behandelten Kontrolle verlängern kann. Neben Überlebenszeit sollte untersucht werden, ob eine ab dem 50. Lebensstag einsetzende orale Behandlung mittels ROCK-Inhibitoren den Symptombeginn verzögern kann. Zusätzlich sollte die motorische Leistungsfähigkeit ab dem 50. Lebensstag alle drei Tage bis zum Erreichen eines Versuchsabbruchskriteriums zwischen den mit ROCK-Inhibitoren behandelten Gruppen und der Wasserkontrolle analysiert werden. Im Anschluss an die Verhaltensexperimente sollte eine immunhistochemische Untersuchung zeigen, ob durch ROCK-Inhibition gegebenenfalls das Überleben der Motoneurone im lumbalen Rückenmark im Vergleich zur Kontrolle verbessert ist.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Standardmaterialien

Geräte	Hersteller
Axioplan Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena (Deutschland)
Axioplan Kamera	Axiocam HRm, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena (Deutschland)
Elektrophoresekammer	BioRad Laboratories, München (Deutschland)
Feinwaage (bis 0,01 g)	LE62025, Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)
Feinwaage (bis 0,1 mg)	BL2105, Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)
Gefrierschnittmaschine (Kryostat)	CM-3050-S, Leica Biosystems GmbH, Nussloch (Deutschland)
Gefrierschrank (-20 °C)	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München (Deutschland)
Gefrierschrank (-80 °C)	Forma, ThermoQuest Analytische Systeme GmbH, Egelsbach (Deutschland)
Gelimager	Bio rad labs, München (Deutschland)
Hamiltonspritze	Hamilton, Bonaduz (Schweiz)
Inkubationsschrank	Heraeus B20, Kendro Laboratory Products GmbH (Deutschland)
Kühlschrank	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen (Deutschland)
Laborwaage (bis 50 g)	Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)
Magnetrührer	Ikamag RH, IKA-Werke GmbH &Co.KG, Staufen (Deutschland)
Mikrowelle	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München (Deutschland)
PCR-Gerät	Cyclone 25, Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen (Deutschland)
pH-Meter	pH-Meter PD20, Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)

Pipetten 0,2-2 µl, 1-10 µl, 2-20 µl, 20-100 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl	Pipetman Classic P2, P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson Inc., Middleton, Wisconsin (USA)
Rotarod	47600, UGO BASILE, Gemonio (Italien)
Schere	Fine Science Tools, Heidelberg (Deutschland)
Schwenktisch	Stuart 3D gyratory rockers – SSM3, Bibby Scientific Limited, Stone (UK)
Vortex Reagenzglas mischer	7-2020, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg (Deutschland)
Wasserbad	3043, Köttermann GmbH & Co.KG, Hänigsen (Deutschland)

**Tabelle 1: Geräte**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Alleinfuttermischung	Ssniff, Soest (Deutschland)
ChAT- Antikörper	Polyclonal goat, AB 144 P, Millipore, Schwalbach (Deutschland)
Deckgläschen	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co.KG, Braunschweig (Deutschland)
Gefriermatrix	Shandon Cyromatrix, Thermo Fisher Scientific Inc., Kalamazoo, Michigan (USA)
Objektträger	ThermoScientific Superfrost Plus, Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co.KG, Braunschweig (Deutschland)
Paraformaldehyd	A3813, AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)
<i>Phosphate buffered solution</i>	A0964, AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)
Pipettenspitzen ohne Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (Deutschland)

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

## 2.2 Studiendesign

Die Erstellung eines Studiendesigns für die erstmalige Testung von ROCK-Inhibitoren in einem ALS-Mausmodell erfolgte sowohl unter Berücksichtigung der „*Guidelines for the preclinical in vivo evaluation of pharmacological active drugs for ALS/MND*“ (Ludolph et al. 2007) als auch der Analyse der Versuchsparameter und Ergebnisse vorheriger SOD1-Therapiestudien. Es wird auch in der vorliegenden Studie das SOD1-(G93A)-Mausmodell der *high copy number* eingesetzt (Turner und Talbot 2008). Als Lieferant für die Stammtiere der neu aufzubauenden Zucht wurde das *Jackson Lab* (Bar Harbor, USA) ausgewählt. Startpunkt der Applikation der ROCK-Inhibitoren war präsymptomatisch am 50. Lebenstag. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen dosisabhängigen Effekte der ROCK-Inhibition wurden mehrere Versuchskohorten randomisiert erstellt und mit unterschiedlichen Tagesmengen von ROCK-Inhibitoren behandelt. Hierbei wurden die zu applizierenden Mengen von Y-27632 mit 2 mg/kgKG/d und Fasudil in den Größenordnungen von 30 mg/kgKG/d sowie 100 mg/kgKG/d ausgewählt. Jede Kohorte sollte eine wie in den angesprochenen Richtlinien geforderte angestrebte Mindestgröße von 12 Tieren umfassen (Ludolph et al. 2007). Aufgrund der signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede im SOD1-(G93A)-Mausmodell wurde für jede ROCK-Inhibitor-Konzentration sowohl eine Kohorte mit weiblichen als auch eine mit männlichen Tieren gebildet (Ludolph et al. 2007; Scott et al. 2008). Als Kontrolle wurden jeweils eine weibliche und eine männliche nur mit Trinkwasser behandelte Kohorte in die Versuchsreihen eingeschlossen. Gleichzeitig mit Beginn der medikamentösen Behandlung der Versuchstiere starteten auch die in einem Dreitageszyklus ablaufenden klinischen Untersuchungen (*clinical score*) und Verhaltensexperimente, um einen möglichst genauen Krankheitsverlauf der Mäuse über die gesamte Versuchsdauer der pharmakologischen Behandlung erheben zu können. Um die Gefahr eines möglichen Bias zu reduzieren, wurden die Versuche für den Untersucher verblindet durchgeführt, und es wurden möglichst Tiere des gleichen Wurfes unterschiedlichen Versuchsgruppen zugeteilt (*litter matched*) (Scott et al. 2008). Wichtige Schritte in der Vorphase der Verhaltensexperimente waren der Aufbau der Zucht sowie die Organisation der Haltung der SOD1-(G93A)-Mäuse und die Etablierung einer PCR mit anschließender Gelelektrophorese zur Genotypisierung der Mäusekolonie sowie die Bestimmung der mittleren täglichen Trinkmenge einer Maus unter unseren Versuchsbedingungen, um die Dosierung der ROCK-Inhibitoren über das Trinkwasser möglichst gut steuern zu können. Zusätzlich waren das Finden und die Etablierung geeigneter Verhaltensexperimente zur Evaluierung der Krankheitsprogredienz sowie die Etablierung der Liquorpunktion an der Maus wichtig, um

testen zu können, ob der ROCK-Inhibitor Fasudil und sein Metabolit Hydroxyfasudil die intakte murine Blut-Hirn-Schranke passieren. Zudem wurden Versuchsabbruchs- und Ausschlusskriterien erstellt (Scott et al. 2008).

### **2.3 Tierversuchsantrag**

Ein Tierversuchsantrag wurde nach § 8 Absatz 1 Tierschutzgesetz für die Bundesrepublik Deutschland (BGBl. I. S. 1206) für die Durchführung der präklinischen Studie an die zuständige Niedersächsische Landesamt für Verbraucher-schutz und Lebensmittelsicherheit mit Sitz in Oldenburg gestellt und unter dem Aktenzeichen G 88.07 mit dem Namen „ROCK-Inhibitoren im ALS-Mausmodell“ genehmigt. Es wurde zusätzlich eine Sondergenehmigung zur Durchführung der Verhaltens-experimente nach § 9 Absatz 1 Satz 4 Tierschutzgesetz (BGBl. I. S. 1206) für den Verfasser dieser Schrift ausgestellt, nachdem dieser regelmäßig und erfolgreich an einem von der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen unter Leitung von Frau Dr. Kimmina durchgeführten tierexperimentellem Kursus teilgenommen hatte.

### **2.4 Zucht der SOD1-G93A-Mäuse und Tierhaltung**

Ausgangspunkt für die hausinterne Zucht des SOD1-(G93A)-Mausmodells der *high copy number* waren drei über *Jackson Labs* bezogene acht Wochen alte für das mSOD1 hemizygote transgene Männchen mit der Bezeichnung B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)-1Gur/J (Stock Number 002726). Es wurde je ein SOD1-transgenes Männchen nacheinander mit je drei ebenfalls über *Jackson Labs* bezogene fünf Wochen alten B6SJL F1/J-Weibchen (Stock Number 100012) verpaart, um die Mäusekolonie schnellstmöglich zu expandieren. Im Weiteren erfolgte die Zucht mit von *Jackson Labs* geordneten Stammweibchen. Die Verpaarung unserer Versuchstiere erfolgte in der ZTE der Universitätsmedizin Göttingen.

### **2.5 Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte unter Verwendung von spezifisch die SOD1-(G93A)-Mutation detektierenden Primern, mit anschließender Gelelektrophorese (Higuchi et al. 1988). Als Ausgangsmaterial dienten von jeder zu genotypisierenden Maus im Alter von zwei bis drei Wochen abgeschnittene Schwanzspitzenbiopsate von zirka 1-1,5 cm Länge. Diese wurden separat in jeweils ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit zusätzlich 200 µl DirectPCR-Lyse-Reagenz (Peqlab, Erlangen) und 10 µl Proteinase K (10 mM in Tris, pH 8, AppliChem, Darmstadt) vermischt über

Nacht in einem Thermoblock (Laboratory devices Inc., Holliston, USA) bei 55 °C inkubiert. Anschließend erfolgte das Denaturieren der Proteinase K in den entstandenen DNA-Lysaten für 45 Minuten bei 85 °C. Die so behandelten DNA-Proben wurden nach einer einstündigen Überbrückungszeit bei Raumtemperatur entweder direkt weiterverwendet oder zunächst bei 4°C zwischengelagert. Je nachdem, wie viele Mäuse zu genotypisieren waren, wurde eine ausreichende Menge eines PCR-Mastermixes frisch angesetzt, der sich für eine 1µl DNA-Probe wie folgt zusammensetzte und entsprechend der zu testenden Probenzahl in multiplizier Form plus einer bei jeder PCR mitlaufenden Positiv- und Wasserkontrolle in gleichen Verhältnisanteilen hergestellt wurde: 2 µl dNTP [Desoxynukleosid-Triphosphat-Mixlösung, Biolab GmbH, München, 2 mM/dNTP in destilliertem Wasser (*aqua dest.*)], 2 µl PCR-Puffer (10x Reaktionspuffer, Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen), je 1 µl Vorwärts- (Primersequenz: 5'-CATCAG CCCTAATCCATCTGA-3", 100 µM, Sigma-Aldrich, München) und 1 µl Rückwärtsprimer (Primersequenz: 5'CGCGACTAACAAATCAAAGTGA-3", 100 µM, Sigma-Aldrich, München), 0,7 µl *Thermophilus aquaticus* (Taq)- Polymerase (Rekombinante DNA-Polymerase, interne Laborherstellung) sowie 12,3 ml *aqua dest.*. Anschließend wurde in der Summe 19 ml dieses Mastermixes in jeweils ein 0,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt und danach 1 µl der bei Vorliegen einer Mutation im SOD1-Gen mittels PCR zu amplifizierenden DNA-Probe hinzugesetzt, die so entstandenen 20 ml ins PCR-Gerät (Cyclone 25, Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen) gestellt und folgendes Amplifikationsprogramm gestartet: *Heated lid 110 Grad Celsius, Preheat lid on, Pause on, In denat 5` 94 °C, Hot start off, - loop 1-, Number of cycles 30, seg 94 °C 30` , seg 55 °C 30` , seg 72 °C 30` . Fin extn 72 °C 5` , Fin hold 4°C.*

Nach Abschluss des PCR-Programmes werden die zu testenden DNA-Proben mit jeweils 3 µl Ladepuffer (15 % Ficoll 400 DL, 100 mM LiCl, 100 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), 0,05 % Bromphenol, in 50 ml *Aqua dest.*) versetzt und anschließend werden zirka 20 ml aus den Eppendorfgefäßen in jeweils eine separate Geltasche eines 1,5% Agarosegeles pipettiert. Für die Herstellung eines solchen Agarosegeles, wird zunächst 0,9 g Agarosepulver (AppliChem, Darmstadt) in 60 ml TBE (1x Tris-Base-EDTA-Puffer) in einem Standkolben unter Zuhilfenahme von Mikrowellenstrahlung solange schrittweise erwärmt, bis sich die Agarose bei in der intermittierend stattfindenden Sichtprüfung vollständig aufgelöst hat. Anschließend wird 1,2 µl Ethidumbromid (10 mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) in den Kolben pipettiert. Nach durch leichtes Schwenken des Standkolbens unterstützter gleichmäßiger Verteilung des Ethidumbromids wird das Agarose/Ethidumbromid-Gemisch vorsichtig in einen Gelschlitten (BioRad Laboratories, München) gegossen. Sogleich werden zwei Gelkämme (Bio-Rad Laboratories, München) zur Taschenbildung getaucht, wobei wie beim

Ausgießen des Gels auch Blasenbildung zu vermeiden ist. Die Auskühlung und damit verbunden das Festwerden des neu entstandenen 1,5% Agarosegels dauert zirka eine Stunde. Anschließend werden die Gelkämme entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer (BioRad Laboratories, München, Pufferflüssigkeit = TBE) überführt, wo es mit den DNA-Proben Tasche für Tasche beladen wird. Bei der nun folgenden zirka 40 minütigen Gelelektrophorese, die bei 100 Volt unter Gleichstrom durchgeführt wird, werden die DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei die negativ geladene DNA zur Anode wandert. Die gleichzeitig durch die Gelporen mitlaufende DNA-Leiter (100 ng/µl, Dianova, Hamburg) ermöglicht eine ungefähre Bestimmung der Kilobasenanzahl des elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Stücks, das durch Bindung an Ethidiumbromid unter dem Ultraviolett (UV)-Licht eines Gelimagers (Bio-Rad Laboratories, München) sichtbar und mit Hilfe eines Fotosystems samt des Computerprogrammes Quantity-One 4.2.2 (Bio-Rad Laboratories, München) dokumentierbar wird. Hierbei ist bei einer transgenen Probe ein 236 Kilobasen großes unter UV-Translumination leuchtendes DNA-Produkt zu erkennen, während eine DNA-Probe ohne Mutation diese Bande nicht aufweist. Für jede zu genotypisierende Maus wurden sowohl PCR als auch Gelelektrophorese zweimal durchgeführt und die Ergebnisse mittels eines Ausdrucks dokumentiert.

## **2.6 Messung der täglichen Trinkmenge einer Maus**

Um eine möglichst genau über das Trinkwasser in gewünschter Dosierung steuerbare tägliche ROCK-Inhibitoraufnahme der Versuchstiere zu gewährleisten, wurde die Trinkmenge mehrerer Wildtypptiere unter den während der gesamten zukünftigen Mäusetestung gleichbleibenden Versuchsbedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen täglich abends mittels einer Laborwaage (Sartorius, Göttingen) bestimmt und im Versuchsverlauf mehrfach validiert. Bei gegebenenfalls verändertem Trinkverhalten wurde so durch Anpassung der zu applizierenden Fasudil- bzw. Y-27632-Konzentrationen die angestrebte Tagesdosis der ROCK-Inhibitoren dem Zielwert der Kohorte entsprechend konstant gehalten.

## **2.7 Applikation der ROCK-Inhibitoren**

Aufgrund der Daten des zuvor evaluierten Trinkwasserverbrauchs wurde von einer täglichen Wasseraufnahme einer Maus unter unseren Studienbedingungen von im Mittel 4 ml ausgegangen. Das mittlere Gewicht einer Maus wurde mit durchschnittlich 20 g berechnet. Für die angestrebte Tagesmenge von 30 mg/kgKG/d Fasudil (LC

Labs, Woburn, USA) ergibt sich hieraus eine benötigte Trinkwasserkonzentration von 0,6 mg/4ml (15 mg/100ml) und für 100 mg/kgKG/d Fasudil von 2 mg/4ml (50 mg/100 ml). Zunächst wurden eine Fasudil-Stocklösung mit jeweils 100facher der gewünschten Konzentration hergestellt und anschließend Aliquots von 1 ml in Eppendorfgefäße abgefüllt. Neigte sich die Trinkwassermenge in einer Trinkflasche dem Ende, wurde 1 ml des Aliquot der benötigten Gruppe mit 99 ml Leitungswasser versetzt und in die Trinkflasche des entsprechenden Mäusekäfigs gefüllt. Die benötigte Y-27632 Menge (Tocris, Ellisville, USA) für 2 mg/kgKG/d wurde nach dem gleichen Verfahren berechnet (0,04 mg/4ml = 1 mg/100mg). Hier wurde anschließend ebenfalls eine Stocklösung in 100 facher Konzentration (100 mg/100 ml) hergestellt und 1 ml Aliquots dieser Lösung abgefüllt, die wiederum jeweils für die Trinkwasserapplikation in 99 ml Leitungswasser verdünnt wurden. Sowohl die beiden unterschiedlichen Fasudil- als auch die Y-27632-Aliquots wurden bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. Die Versuche wurden für den Durchführenden der Verhaltensuntersuchungen verblindet durchgeführt. Dieses wurde durch das Etablieren eines Zahlencodes erreicht.

## **2.8 Liquorpunktion bei der Maus und Nachweis von ROCK-Inhibitoren im *Liquor cerebrospinalis***

Die Liquorentnahme zur Bestimmung der Konzentration von Fasudil nach vorheriger oraler Applikation erfolgte als Finalversuch mit Hilfe einer Hamiltonspritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) aus der *cisterna magna* bei durch CO<sub>2</sub>-Insufflation tief anästhesierten, zirka sechs Wochen alten Wildtypmäusen. Hierbei fand eine der Publikation von Fleming und Mitarbeiter ähnliche Vorgehensweise Anwendung (Fleming et al. 1983). Ziel des operativen Eingriffes war es, den äußeren Liquorraum einer Wildtypmaus möglichst atraumatisch mittels der Hamiltonspritze zu punktieren. Es sollte hierbei möglichst keine Blutkontamination entstehen und so viel Liquor für die anschließende Fasudilbestimmung gewonnen werden wie möglich. Die zu operierende Maus wurde zunächst mittels CO<sub>2</sub>-Insufflation tief narkotisiert und die Sedationstiefe mittels Reflexprüfung validiert. Anschließend erfolgte eine Durchtrennung des Fells und Unterhautfettgewebes durch einen horizontal zur Körperachse geführten Scherenschnitt (FST, Heidelberg). Sogleich wurde die paarige Nackenmuskulatur zwischen *Os occipitale* und Atlasbogen stumpf nach lateral präpariert, wobei zunächst die okzipital gelegenen Muskelansätze direkt vom Knochen abgetrennt wurden. Durch vorsichtiges Tasten und mittels Zeigefingerkuppe erfolgenden Widerstandsprüfung, konnte der direkte Weg zur *Dura mater* zwischen *Os occipitale* und *Atlas* validiert werden. Diese zeigte sich nach Abpräparation der

Muskeln als trianguläre weiß-bläuliche Membran, auf der teilweise Blutgefäße sichtbar waren. Behutsam wurde nun die Hamiltonspritze zwischen den Blutgefäßen hindurch auf die Membran hin zugeführt und diese vorsichtig durchstoßen. Circa 1,5 µl blutfreien *Liquor cerebrospinalis* konnten durch dieses Vorgehen für die spätere mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie durchgeführte Fasudilmessung gewonnen werden (Fleming et al. 1983).

## **2.9 Verhaltensexperimente**

### **2.9.1 Haltung der Versuchstiere**

Die für die Versuche vorgesehenen SOD1-transgene Mäuse wurden in einen Tierstall mit einem umgekehrten Tag-Nacht-Rhythmus gebracht, wobei die Phase der Dunkelheit zwischen 9 und 21 Uhr bestand. Dieses ermöglichte die Testung der Versuchstiere zu ihrer normalen nachtaktiven Phase und vermied eine Störung der Mäuse in ihrer Ruhephase bei Helligkeit. Die Versuchstiere wurden getrennt nach Geschlecht in Gruppen von in der Regel zwei bis drei Tieren in jeweils einem Versuchstierkäfig aus Plastik, ausgestattet mit einem IVC-System (IVC = *individually ventilated cage*) und mit Normalstreu ausgelegt, gehalten. Die Mäuse hatten jederzeit die Möglichkeit zu Futter- und Trinkwasseraufnahme *ad libitum*. Die Ernährungsgrundlage bestand aus einer vollwertigen Alleinfuttermischung (ssniff, Soest). Sowohl Temperatur als auch Luftfeuchtigkeit wurden im Versuchsraum stets konstant bei 23 °C beziehungsweise 60% Luftfeuchte gehalten. Während der täglich im Versuchstierraum stattfindenden Verhaltensexperimente wurde ausschließlich eine Rotlichtlampe verwendet, um die Mäuse nicht in ihrem Tag-Nacht-Rhythmus zu stören. Zusätzlich wurde die Geräuschbelastung der Mäuse gering gehalten, um eventuell aufgrund lärmbedingter Irritation der Mäuse entstehende Messfehler möglichst zu vermeiden. Alle zu testenden Mäuse wurden spätestens an ihrem 35. Lebenstag in den Versuchstierraum gebracht, damit sie sich ausreichend lange an die Versuchsbedingungen akklimatisieren konnten. Regelmäßig erfolgte eine für alle SOD1-(G93A)-Mäuse in gleicher Weise durchgeführte Trainingsphase, damit sich die Mäuse an die Handhabung und Verhaltensexperimente gewöhnen konnten.



### 2.9.2 Versuchsabbruchs- und –ausschlusskriterien

Ab dem 50. Lebenstag wurde allen Versuchstieren regelmäßig alle drei Tage mittels eines klinischen Untersuchungsschemas (*clinical score*) ein Punktwert anhand des Gesamterscheinungsbildes der jeweiligen Maus zugeordnet.

Punktwert	Klinisches Erscheinungsbild
4	gesund
3	pathologischer Reflex der Hinterbeine beim Anheben am Schwanz
2	erste Lähmungserscheinungen der Extremitäten (verändertes Gangbild)
1	Lähmung mindestens einer unteren Extremität bei erhaltender Funktion der oberen Extremitäten, das Tier ist in der Lage, selbstständig Futter oder Wasser zu sich zu nehmen
0	Unfähigkeit des Tieres, sich selbstständig in weniger als 30 Sekunden aus der Rücken- in die Bauchlage zu drehen oder Lähmungserscheinungen in mehr als zwei Extremitäten oder das Tier ist nicht in der Lage, selbstständig Futter oder Wasser zu sich zu nehmen oder das Tier hat mehr als 25% des Maximalgewichtes verloren oder das Tier hat über 48 Stunden einen Gewichtsverlust von über 20% des Maximalgewichtes, ohne dass in dieser Zeit eine erneute Gewichtszunahme erreicht werden kann

Tabelle 3: Klinisches Bewertungsschema (*clinical score*)

Hierbei wird das erstmalige Erreichen eines Punktwertes von unter vier mit dem jeweiligen Krankheitsbeginn der Maus gleichgesetzt. Sobald ein Tier null Punkte erzielt, ist ein Versuchsabbruchskriterium erfüllt und die entsprechende Maus wird sofort schmerzlos mittels CO<sub>2</sub>-Insufflation eingeschläfert.

### 2.9.3 Verhaltensexperimente zur motorischen Testung

Es wurde der Tretmühlentest (*Rotarod*) zur Messung der Muskelkraft, Koordination und des Gleichgewichts verwendet. Zusätzlich wurde der Hängeversuch (*Hanging wire*) zur Messung der Muskelkraft eingesetzt. Es wurde ein Dreitageszyklus der Verhaltensexperimente festgelegt. Wie in der Studie von Miana-Mena und Mitarbeitern (2005) empfohlen, fand zusätzlich eine klinische Untersuchung mittels eines *clinical score* (Tabelle 3) statt.

#### 2.9.3.1 Drehwalzentest (*Rotarod*)

Bei diesem Versuch werden die Mäuse auf einen um die eigene Achse rotierenden Zylinder (UGO BASILE, 47600 *Rota-Rod for mice*) gesetzt, und es wird die Zeit gemessen, die die Mäuse durch aktives Mitlaufen auf der Walze verbleiben. Die Versuchsdauer beträgt 180 Sekunden bei einer konstanten Drehgeschwindigkeit von 15 rpm (*rounds per minute*) (Miana-Mena et al. 2005). Fallen Mäuse vorzeitig von der Walze (Höhe zirka 12 cm), betätigen sie einen Kontakt, der eine bei Versuchsbeginn gestartete Stoppuhr anhält. Bei Nichterreichen des Maximalwertes von 180 Sekunden wird der Versuch nach einer Ruhezeit von jeweils mindestens 10 Minuten pro Maus maximal zwei Mal wiederholt. Es wird nur der beste der drei Versuchsanläufe gewertet. Die maximal gemessene Zeit gilt als Korrelat für Koordinationsfähigkeit, Gleichgewicht und Muskelkraft bei Ausdauerbelastung der Mäuse und vermindert sich bei Krankheitsprogredienz. Durch Vergleich der Kohortenergebnisse, die ab dem 50. Lebenstag bis zum Erreichen eines Versuchsabbruchskriteriums alle drei Tage aufgezeichnet werden, lassen sich eventuelle Therapieeffekte der medikamentösen ROCK-Inhibition detektieren (Günther et al. 2012).

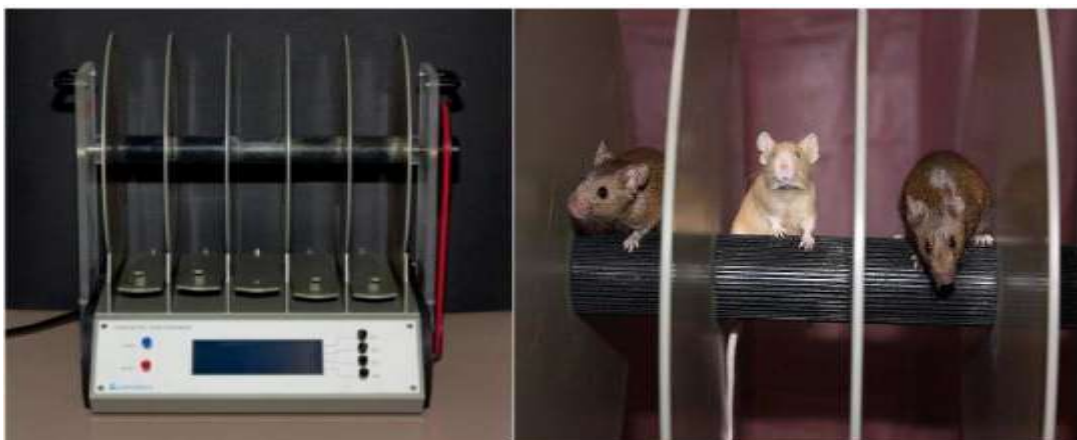


Abbildung 1: Drehwalzengerät (*Rotarod*) (Quelle: eigenes Bildmaterial)

### 2.9.3.2 Gitterhängetest (*Hanging wire*)

Für diesen Versuch werden die Mäuse von unten an ein Käfiggitter gesetzt, welches sich in zirka 55 cm Höhe befindet. Fallen Mäuse innerhalb der Versuchszeit von 180 Sekunden herunter, wird die Zeit mittels Stoppuhr protokolliert. Nach einer Ruhe-phase von jeweils mindestens zehn Minuten pro Maus erfolgen bei Nichterreichen der maximalen Hängezeit bis zu zwei weitere Versuche. Das längste Hängeintervall fließt als Tagesergebnis dieser Maus in die Versuchsergebnisse ein (Günther et al. 2012).



Abbildung 2: Gitterhängetestvorrichtung (*Hanging wire*) (Quelle: eigenes Bildmaterial)

### 2.9.3.3 Dreitageszyklus der Verhaltensexperimente

Mit Erreichen des 50. Lebensstages erfolgt für jede Maus nach dem individuell bestehenden Lebenstag ein standardisiertes Versuchsprogramm, welches ohne Abweichung bis zum Erreichen eines Versuchsabbruchkriteriums durchgeführt wird. Hiermit wird eine größtmögliche Genauigkeit und Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse über den gesamten Studienverlauf hinweg sichergestellt.

Lebenstag	Testung
50	<i>clinical score, Rotarod</i>
51	<i>Hanging wire</i>
52	keine Testung

Tabelle 4: Tierversuchsschema

## **2.10 Versuchsbeendigung und Gewebegewinnung**

### **2.10.1 Anästhesie der Mäuse**

Das in der Studie angewendete Verfahren zur Anästhesie und Einschläferung der Versuchstiere nach Erreichen eines Versuchsabbruchkriteriums war die CO<sub>2</sub>-Insufflation. Zu diesem Zweck wird die zu narkotisierenden Mäuse einzeln in eine mit Normalstreu ausgelegte Plastikbox (60 cm x 40 cm x 25 cm) gesetzt, in die durch ein Loch, in dem sonst die Box komplett verschließenden Deckels, mit Hilfe eines Schlauches CO<sub>2</sub> eingeleitet wird. Nach einer kurzen Phase der Hyperventilation (10-30 Sekunden nach Beginn der CO<sub>2</sub>-Insufflation) beginnt die Maus regelhaft zu taumeln und geht langsam in die Schnappatmung über. Zu diesem Zeitpunkt ist die Plastikbox ausreichend mit CO<sub>2</sub> gefüllt und die Gaszufuhr kann gestoppt werden. Nach weiteren zirka 10 Sekunden hört die Maus auf zu atmen. Um sicher zu gehen, dass die Betäubung eine ausreichende Tiefe besitzt, wird das Tier für weitere 5-10 Sekunden in der Plastikbox belassen und anschließend auf Schmerzreaktionen hin untersucht. Die zu prüfenden Schmerzreflexe bestanden hierbei aus Kneifen in den Schwanz und des ersten Interdigitalraumes sowohl an den Ober- als auch der Unterextremitäten beidseits. Zusätzlich wurde der Pupillenreflex auf beiden Seiten geprüft. Nur wenn weder eine Reaktion der Maus auf Schmerzreize noch auf Reflexe erfolgt, kann mit der Operation begonnen werden. Zwischen den einzelnen Betäubungsvorgängen muss die Plastikbox zum Austausch des hochkonzentrierten und dadurch toxisch wirkenden CO<sub>2</sub>-Gases in normale Raumluft für mindestens eine Minute auf die Seite gekippt werden.

### **2.10.2 Transkardiale Perfusion einer Maus**

Die transkardiale Perfusion ist eine essentielle, der Rückenmarksentnahme an der Maus vorgeschaltete, Operation. Zu diesem Zweck wird das durch CO<sub>2</sub>-Narkose tief sedierte Tier zunächst mit dem Rücken auf eine mit Aluminiumfolie bekleidete Styroporunterlage gelegt und mittels Nadeln locker an allen vier ausgestreckten Extremitäten auf der Unterlage fixiert. Hierbei ist darauf zu achten, dass der Mäusekörper nicht zu sehr unter Spannung steht, da sonst die folgenden chirurgischen Eingriffe durch eine fehlende Hautmobilität erschwert werden. Vor Beginn des ersten Schnittes wird noch einmal die Abwesenheit sämtlicher Schmerzreflexe überprüft. Anschließend wird zunächst das Abdomen eröffnet und von kaudal das Diaphragma zirkular vom Rippenbogen präpariert. Durch Eröffnung des Thoraxtraumes kollabieren die Lungen, und es werden die Rippen beidseits lateral nach kranial durchtrennt. Durch Elevation des Sternums wird nun das noch

pulsierende Herz sichtbar. In die linke Herzkammer wird vorsichtig eine Butterflykanüle eingeführt, und es wird mit der Perfusion von mindestens 30 ml filtriertem und gekühltem PBS begonnen. Während der gesamten Eröffnung des Mäusekörpers bis zum Beginn der Perfusion ist auf zügiges Arbeiten zu achten, da das Mäuseherz nur in einem Zeitfenster von zirka zwei bis drei Minuten weiterschlägt und somit die Perfusion erleichtert. Zum Abfluss des aus dem Gefäßsystem zu verdrängenden Blutes werden die Lebervenen der Maus mit drei diagonalen Inzisionen in der Frühphase der Perfusion eröffnet. Nachdem das aus den Lebervenen fließende PBS-Blutgemisch klar durchscheinend geworden ist, kann mit der transkardialen Perfusion von 4% filtriertem und gekühltem Paraformaldehyd (PFA) begonnen werden. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Position der Butterflynadelspitze nicht verändert wird. Gütekriterien für eine erfolgreich durchgeführte Perfusion sind die Elevation und das Starrwerden des Mäuseschwanzes während der PFA-Injektion.

### **2.10.3 Rückenmarksentnahmetechnik bei der Maus**

Die durch transkardiale Perfusion mittels PFA fixierte Maus wird für die nun folgende Rückenmarksentnahme in Bauchlage gedreht und das dorsale Muskelprofil mittels eines von Kopf bis Schwanzansatz mit einem Skalpell durch Fell und Unterhautfettgewebe gezogenen Schnittes freigelegt. Um die Schnitfführung durch das Mäusefell zu erleichtern, wird dieses vorher mit Wasser benetzt. Nach erfolgter Freilegung der Muskulatur, wird diese bis zum Erreichen der Wirbelsäule von kranial nach kaudal von Ursprung und Ansatz präpariert. Zu diesem Zweck ist es hilfreich den Mäusekörper möglichst beweglich in der nicht schnitfführenden Hand zu lagern. Durch diese Methode kann ein ausreichendes Maß, der für eine saubere Präparation benötigten Zugspannung und gleichzeitig hinreichend viel Lagerungsspielraum, zur Nutzung des bestmöglichen Schnittwinkels, erreicht werden. Die mittels Skalpell durchtrennten Muskelpartien können, unter Zuhilfenahme einer gebogenen Pinzette (Fine Science Tools, Heidelberg), gut aus ihrer ursprünglichen Lage gelöst und entfernt werden. Bei der anschließend erfolgenden Eröffnung des Wirbelkanales ist auf eine besondere Behutsamkeit zu achten. Hierdurch wird vermieden, dass die durch eine in der Spitze abgewinkelte Schere (Fine Science Tools, Heidelberg) an beiden Seiten möglichst lateral durchtrennten Wirbelbögen das Rückenmarksgewebe verletzen. Die vorsichtige Abpräparation knöcherner Strukturen erfolgt von kranial nach kaudal unter Zuhilfenahme optimaler Lagerungstechnik in der Handfläche des Operateurs und unter ständiger Flexion des Mäusekopfes (Günther et al. 2012). Ist das komplette Rückenmark freigelegt, erfolgt eine separate Durchtrennung sämtlicher Spinalnervenwurzeln unter Erhalt des proximalen Abschnittes (zirka 5 mm).

Anschließend wird das zuvor durch einen Scherenschnitt vom Gehirn getrennte Rückenmark *in toto* aus dem Mäusesitus gehoben. Es folgt eine drei bis vierstündige Postfixation des entnommenen Gewebes in 4% PFA, an die sich eine Dehydratation in 30% Sucroselösung über Nacht anschließt. Die Rückenmarkspräparate werden bis zum Cryoschnitten bei minus 80 °C in einem Gefrierfach (Bosch, Stuttgart) zwischengelagert.

## **2.11 Immunhistochemie und quantitative Auswertungen**

### **2.11.1 Anfertigen von Cryoschnitten**

Die für die immunhistochemischen Färbungen benötigten 20 µm dicken Cryoschnitte des lumbalen Rückenmarks werden mit Hilfe eines Cryostats (CM-3050-S, Leica Biosystems, Nussloch) angefertigt. Innerhalb der Schneidemaschine wird hierzu eine Arbeitstemperatur von minus 18 °C und eine Oberflächentemperatur von minus 20 °C eingestellt. Zunächst wird das vorher mittels Skalpell vom restlichen Rückenmark abgetrennte Lumbalstück durch langsames Einbetten in Cryomatrix (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) auf dem Schneidesockel fixiert und unter immer gleich bleibender Winkелеinstellung durch Auf- und Abbewegung der Klinge geschnitten. Diese erfolgt durch die Betätigung einer an der Seite des Cryostats befindlichen Kurbel. Um die Aussagekraft der anschließenden histologischen Analyse zu verbessern, wurden mehrere Schnitte des lumbalen Rückenmarks in einem Abstand von jeweils 100 µm für die spätere Auswertung auf einen Objektträger (Menzel-Gläser Superfrost, Menzel, Braunschweig) unter Zuhilfenahme einer Pinzette (Fine Science Tools, Heidelberg) aufgezogen und nach dem Färbevorgang ausgewertet. Bis zum Beginn der immunhistochemischen Färbung werden die Cryoschnitte bei minus 20 °C gelagert.

### **2.11.2 Immunhistochemische Färbungen**

Das Prinzip der Immunhistochemie ist das Detektieren von Antigenstrukturen mit Hilfe spezifischer an die gewünschten Strukturen bindenden primärer Antikörper. Im zweiten Schritt binden an diese ersten Antikörper sekundäre Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind und mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden können. Es werden die zunächst zur Immunhistochemie vorgesehenen Cryoschnitte für 40 Minuten in einem Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet und anschließend für 45 Minuten in PBS rehydriert. Anschließend werden die Objektträger für 6 Stunden in ein Wasserbad (60 °C) in *TrisBase-solution* (TBS, 24,2 g TrisBase, 80 g Natriumchlorid auf 1000 ml, pH 8,98) gestellt, das der korrekten

Faltung der Antigenstrukturen dient. Es folgt eine zweimalige fünfminütige Waschung der Objektträger in PBS. Dann werden die unspezifischen Bindungsstellen der Rückenmarksschnitte mittels einer 30 minütigen Behandlung durch DakoDiluent (DAKO, Hamburg) geblockt. In einem weiteren Versuchsansatz wurde anstelle des Dako-Diluents *normal goat serum* als Blockmittel verwendet. Nach erfolgter Inkubation wird das DakoDiluent, beziehungsweise NGS, von den Schnitten abpipettiert und 50 ml *choline acetyltransferase* (ChAT)- Antikörper (polyclonal rabbit, AB 143, Millipore, Schwalbach) als Motoneuronmarker auf die Rückenmarksschnitte gegeben. Hierbei wurden zwecks Findung möglichst geeigneter Antikörperkonzentrationen zunächst mehrere Verdünnungen der primären Antikörper angesetzt. Diese erfolgte immer spezifisch für die jeweiligen Rückenmarksschnitte mit derjenigen Substanz, mit der die Gewebe zuvor auch geblockt wurden. Als Negativkontrolle wird bei jeweils einem Schnitt pro Objektträger das Blockmittel auf dem Rückenmarksgewebe belassen und kein erster Antikörper hinzupipettiert. Alle mit dem ersten Antikörper behandelten Schnitte werden zusammen mit den Kontrollen anschließend über Nacht bei 4 °C in einem abgedunkelten Kühlraum inkubiert. Am nächsten Morgen wird zunächst der primäre Antikörper von den Objektträgern pipettiert. Sogleich werden die Objektträger fünfmal fünf Minuten in PBS gewaschen. Hiernach wird zu jedem Schnitt 50 ml des zweiten Antikörpers in einer Verdünnung von 1:500 in DakoDiluent beziehungsweise NGS gegeben und für eine Stunde abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Im Zuge der Etablierung der immunhistochemischen Färbung wurden für jedes Blockmittel und jede Konzentration des ersten Antikörpers jeweils sowohl Cy2 (Carbocyanin 2, 1:300, Dianova, Ziege anti-Kaninchen) als auch separat Cy3 (Carbocyanin 3, 1:300, Dianova, Ziege anti-Kaninchen) als sekundärer Antikörper getestet. Nach Inkubation des sekundären Antikörpers werden die Rückenmarksschnitte dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen und anschließend für zehn Minuten mit dem Zellkernfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 1:2000, 1:10 mit CH<sub>3</sub>OH 1:2000 mit PBS) inkubiert. Auch dieser Schritt muss aufgrund der Lichtempfindlichkeit der sekundären Antikörper unter abgedunkelten Bedingungen geschehen. Die Schnitte werden danach noch zweimal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen, anschließend für zirka 30 Minuten an der Luft getrocknet und schließlich vorsichtig mit DABCO (Flika Polyvinylalkohol) eingedeckelt. Nach Färbung der Motoneurone durch die Methode und Evaluation der aufgenommenen Bilder wurde zwecks einer verbesserten Spezifität der Färbung und zum Test einer gewünschten Reproduzierbarkeit ein verändertes Motoneuronfärbeprotokoll mit einem aus der Ziege gewonnenen ChAT-Antikörper (polyclonal goat, AB 144 P, Millipore, Schwalbach) verwendet.

Hierfür wurden die zu färbenden Schnitte und wie im vorhergehenden immunhistochemischen Protokoll für 40 Minuten in einem Wärmeschrank bei 37 °C

getrocknet. Hiernach werden die Objektträger 45 Minuten in PBS rehydriert. Das nun folgende Wasserbad (80 °C) findet in 10 mM Natriumhydroxid (NaOH, Tocris Bioscience, United Kingdom) bei pH 9 für 30 Minuten statt. Nach 10 minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur werden die Objektträger einmal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Für die nun folgende einstündige Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wird ein Gemisch aus 5 % *normal donkey serum* (NDS) und 0,2% Triton X-100 in PBS verwendet. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Blockmittels wird der aus der Ziege gewonnene ChAT-Antikörper (Polyclonal goat, AB 144 P, Millipore, Schwalbach) in einem Verhältnis von 1:100 in PBS auf die Schnitte pipettiert und für drei Nächte bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Rückenmarksschnitte dreimal für 15 Minuten in PBS gewaschen. Die Inkubationszeit des sekundären Antikörpers Cy3 (1:300, Dia-nova, *rabbit anti-goat*) beträgt bei Raumtemperatur eine Stunde. Hiernach erfolgt ein dreimal 15-minütiges Waschen der Objektträger in PBS. Nun werden die Schnitte für zehn Minuten mit DAPI behandelt. Hieran schließt sich ein erneuter Waschvorgang in PBS für dreimal fünf Minuten an. Um Ausbleichungseffekte (*bleaching*) des sekundären Antikörpers möglichst zu minimieren, erfolgen alle nach dessen Zugabe erfolgenden Arbeitsschritte in einem abgedunkelten Raum. Im Anschluss an eine mehrstündige Trocknungsphase der Objektträger bei Raumtemperatur werden die Rückenmarksschnitte mit vorgewärmtem Mowiol eingedeckelt. Bis zum zeitnahen Mikroskopieren mittels eines Axioplan Fluoreszenzmikroskops (Zeiss, Jena) und der Bildaufnahme sowie -verarbeitung mit Hilfe einer Axiokamera und der AxioVision-Software 4.8 (Zeiss, Jena), werden die gefärbten Schnitte bei 4 °C abgedunkelt zwischengelagert.

### **2.11.3 Quantifizierung der Motoneurone im Rückenmarksvorderhorn**

Für das Identifizieren der Motoneurone im lumbalen Rückenmarksvorderhorn wurden die bei Pitzer et al. definierten Kriterien zur Motoneuronquantifizierung ChAT-Positivität, ein klar identifizierbarer Nucleolus und eine Zellgröße von mehr als 400  $\mu\text{m}^2$  verwendet (Pitzer et al. 2008). Hierzu wurde die ventral des *Canalis centralis* unilateral gelegene graue Substanz als Vorderhorn definiert. Diese wurde bei 20-facher Vergrößerung des Fluoreszenzmikroskops durch die Axiokamera fotografiert und mit Hilfe des Programmes Image J ausgemessen. Anschließend wurde die absolute Motoneuronanzahl durch die Gesamtvorderhornfläche geteilt und die mittlere Motoneurondichte bestimmt.



## 2.12 Statistische Auswertungen

Die statistische Analyse insbesondere der verhaltensexperimentellen Daten erfolgte nach Beratung durch die Abteilung für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen (Direktor Prof. Dr. Friede) und unter Verwendung der Programme Statistika (StatSoft, Hamburg) sowie Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Es wurde der *Cox hazard test* für die Überlebens- und Verhaltensdaten mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angewendet. Die immunhistochemischen Analysen wurden mit Hilfe der *one-way Anova* durchgeführt. Aufgrund der Insignifikanz wurde hier keine *post-hoc*-Analyse durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Tierzahlen in den einzelnen Kohorten

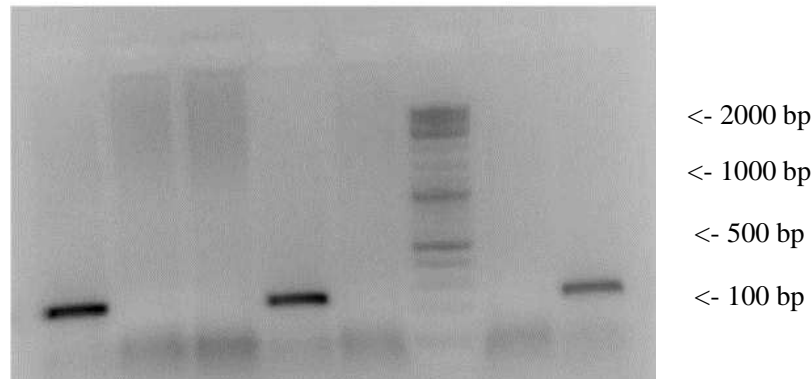
Die angestrebte Tierzahl konnte in allen weiblichen Verumkohorten eingehalten werden und belief sich wie folgt:

Behandlung	Weibliche Tiere	Männliche Tiere
<i>Vehicle</i> -Kontrolle (parallel zu <i>Fasudil low</i> und <i>high</i> )	14	11
<i>Fasudil low</i> (30 mg/kgKG/d)	13	10 (plus 1 zensiertes Tier)
<i>Fasudil high</i> (100 mg/kgKG/d)	17	13
<i>Vehicle</i> -Kontrolle (parallel zu Y-27632)	4	3
Y-27632 (2 mg/kgKG/d)	13	10 (plus 1 zensiertes Tier)

Tabelle 5: Versuchsgruppen

#### 3.2 PCR mit anschließender Gelelektrophorese

Die PCR erwies sich als zuverlässige Methode zur Genotypisierung der gezüchteten Mäuse. Das Ergebnis jeder einzelnen DNA-Probe ließ sich reproduzieren. Eine Validierung der Ergebnisqualität der PCR erfolgte durch das Mitlaufenlassen einer DNA-Leiter, mit deren Hilfe die Größe des Genproduktes überprüft werden konnte. Dieses lag regelhaft bei 236 Basenpaaren. Außerdem wurden bei jeder PCR sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle mitgeführt.



pos. neg. neg. pos. neg. DNA-Leiter pos.-Kontrolle

**Abbildung 3: Gelelektrophorese zur Genotypisierung.** Es zeigt sich ein Genprodukt von 236 Basenpaaren (bp) bei einer DNA-Probe von transgenen Tieren, wt = *wildtype*, tg = transgen (Quelle: eigenes Bildmaterial)

### 3.3 Ergebnisse der Testung des *Liquor cerebrospinalis* nach Fasudilapplikation

Insgesamt wurden je fünf Wildtypiere unterschiedlichen Geschlechts mit einer Fasudildosis von 30 mg/kgKG/d (*Fasudil low*) und 100 mg/kgKG/d (*Fasudil high*) für zehn Tage, unter identischen Studienbedingungen wie die späteren Versuchstiere, *per os* behandelt und im Anschluss jeder Maus zirka 1,5 µl Liquor entnommen. Anschließend wurde sowohl die Menge des vorhandenen Fasudils als auch seines aktiven Metaboliten Hydroxyfasudil (OH-Fasudil) gemessen. Ziel war es zu zeigen, dass sich sowohl Fasudil als auch OH-Fasudil trotz intakter Bluthirnschranke im Liquor nachweisen lassen. In allen entnommenen Proben wurden beide ROCK-Inhibitorformen gefunden. Bei der mit 30 mg/kg/KG/d behandelten Gruppe finden sich für Fasudil Extremwerte von 1,2 pg (Min) und 34,4 pg (Max) mit einem Mittelwert von 13,8 pg. Für OH-Fasudil liegt der Mittelwert bei 18,8 pg, wobei die Einzelwerte im Bereich zwischen 7,9 und 36,6 pg schwanken. Eine Liquorprobe war blutkontaminiert. Als Maximalwert findet sich bei einer mit 100 mg/kg/KG/d behandelten Maus eine Fasudilmenge von 143,7 pg/1,5 µl und bei einer anderen Maus gleicher Behandlung ein Minimalwert von 12,3 pg/1,5 µl. Der Mittelwert für diese Fasudilbehandlungsgruppe liegt bei 54,7 pg. In der gleichen Gruppe findet sich ein Mittelwert für OH-Fasudil von 43,5 pg. Die OH-Fasudilmesswerte weisen Werten zwischen 17,9 - 59,7 pg auf.

Behandlung	Fasudil Mittelwert (pg)	OH-Fasudil Mittelwert (pg)
A = 30 mg/kgKG/d	13,8 (n =5)	16,8 (n =5)
B =100 mg/kgKG/d	58,7 (n =5)	43,5 (n =5)
Verhältnis A/B	4,25	2,59

**Tabelle 6: Mittelwerte und Verhältnisse der Liquormengen**

Im Vergleich der beiden Fasudilbehandlungsmodalitäten untereinander führte die zehntägige Applikation von 100 mg/kgKG/d Fasudil im Verhältnis zu der Behandlung mit 30 mg/kgKG/d zu einer 4,25-fach höheren Fasudilmenge und einer zirka 2,59-fach höheren OH-Fasudilkonzentration im Liquor der Maus.

### 3.4 Überlebensanalysen

#### 3.4.1 Ergebnisse der Fasudilbehandlung der Weibchen

Im Paarvergleich zur Kontrollkohorte ist das Überleben der mit 30 mg/kgKG/d Fasudil behandelten Weibchen im *Cox hazard test* mit einem p-Wert von 0,024 signifikant verlängert (Abbildung 4). Das durchschnittliche Überleben der mit 30 mg/kgKG/d Fasudil behandelten weiblichen Tiere beträgt  $141,6 \pm 13,0$  Tagen. Da das durchschnittliche Überleben der Kontrollkohorte  $131,3 \pm 6,4$  Tage beträgt, lebt jedes mit *Fasudil low* behandelte Weibchen durchschnittlich 10,3 Tage länger als ein unbehandeltes Tier. Das durchschnittliche Überleben der 100 mg/kgKG/d- Fasudilkohorte ist mit  $134,4 \pm 10,0$  Tagen im Vergleich zu den anderen Kohorten nicht signifikant verlängert  $p = 0,43$  (Abbildung 4 und Tabelle 7). Mit *Fasudil high* behandelte Weibchen leben durchschnittlich 3,1 Tage länger als die Mäuse der Kontrollgruppe. In der Fasudilkohorte 100 mg/kgKG/d finden sich mit 142, 151 und 156 Tagen Lebensspanne 3 Tiere, die länger als jede Kontrollmaus gelebt haben. In der *Fasudil low*-Gruppe sind es im Vergleich 5 Tiere, wobei eine Maus mit dem Maximalwert mit 164 Tagen 23 Tage älter als das am längsten überlebende Kontrollweibchen (141 Tage) wurde.

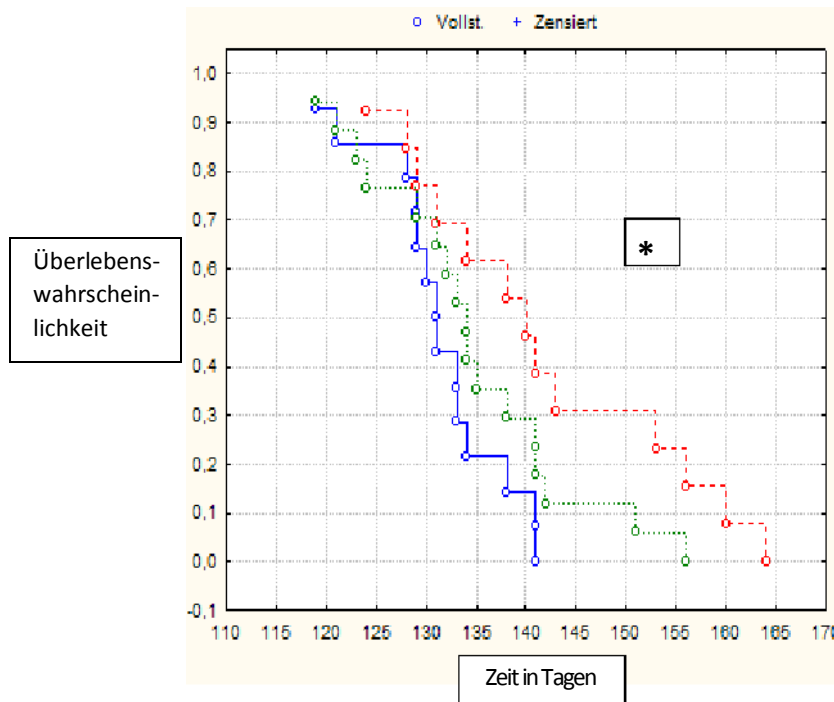


Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurve für die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Fasudilbehandlung (Weibchen). Blau: *Vehicle* (n =14), rot: *Fasudil low* (n =13), grün: *Fasudil high* (n=17), p (alle) = 0,431 (Cox hazard), p (Vergleich blau mit rot) = 0,024\* (Cox hazard).

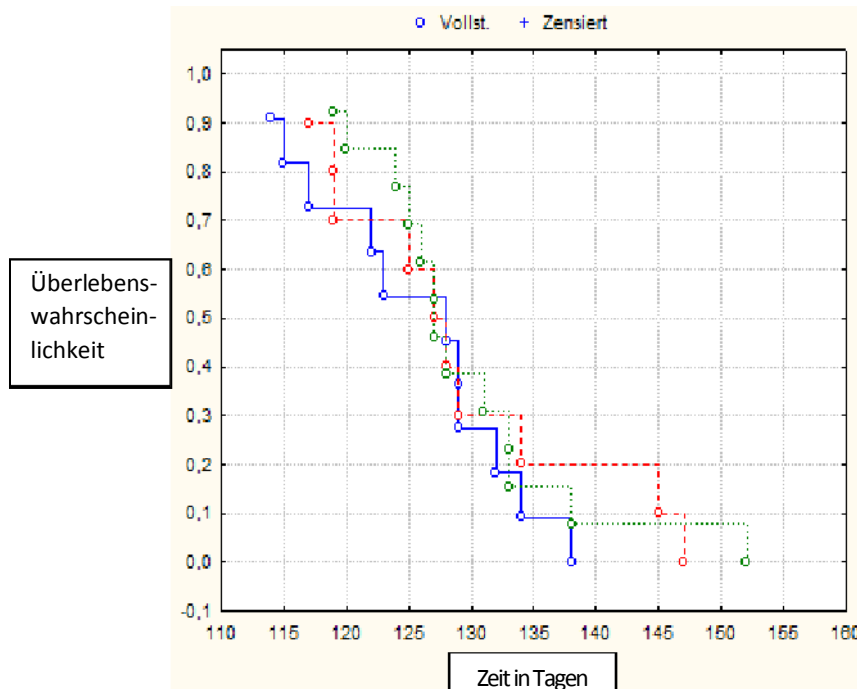
Versuchsgruppen	<i>Vehicle</i>	<i>Fasudil low</i>	<i>Fasudil high</i>
♀ Weibchen	131,3 ± 6,4 Tage	141,6 ± 13,0 Tage	141,6 ± 13,0 Tage

Tabelle 7: Überlebenswahrscheinlichkeit nach Fasudilbehandlung (Weibchen). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

### 3.4.2 Ergebnisse der Fasudilbehandlung der Männchen

Weder eine Behandlung mit 30 mg/kgKG/d noch mit 100 mg/kgKG/d Fasudil führte bei den Männchen im Vergleich mit der Wasserkontrolle zu einem signifikanten Überlebensvorteil (p = 0,431) (Abbildung 5). Durchschnittlich lebten mit *Fasudil low* behandelte Männchen  $129 \pm 10,4$  Tage und Mäuse der *Fasudil high*-Kohorte  $129,5 \pm 8,6$  Tage. Da das Überleben der männlichen Kontrolltiere im Durchschnitt  $125,6 \pm 8,0$  Tage betrug, lebten auch bei den Männchen die mit ROCK-Inhibitoren behandelten Mäuse länger als die Kontrolltiere ohne jedoch ein Signifikanzniveau zu erreichen (Tabelle 8). Hierbei beträgt der durchschnittliche Überlebensvorteil jeweils im Vergleich zu mit Wasser behandelten Männchen für *Fasudil low* 3,4 und für *Fasudil high* 3,9 Tage. In der Kohorte mit 100 mg/kgKG/d Fasudil findet sich ein maximales Überleben eines Männchens von 152 Tagen. Das Tier, welches aus der gleichen Kohorte am zweitlängsten überlebte, starb mit 138 Tagen. Letzteres entspricht genau

dem gleichen Alter wie die maximale Überlebenszeit eines Kontrollmännchens. Die Differenz zwischen dem Tier mit maximalem Überleben der *Fasudil high*-Kohorte zur mit Wasser behandelten Kohorte beträgt somit 14 Tage. Auch in der *Fasudil low*-Gruppe findet sich mit 145 und 147 Tagen Überlebenszeiten, die aus den übrigen Werten dieser Kohorte hervorstechen. So beträgt der Abstand zum am nächstlängsten überleben Tier in der *Fasudil low*-Kohorte 11 bzw. 13 Tage.



**Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve für die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Fasudilbehandlung (Männchen). Blau: *Vehicle* (n =11), rot: *Fasudil low* (n =10), grün: *Fasudil high* (n=13), p = 0,431 (Cox hazard).**

Versuchsgruppen	<i>Vehicle</i>	<i>Fasudil low</i>	<i>Fasudil high</i>
Männchen	125,6 ± 8,0 Tage	129 ± 10,4 Tage	129,5 ± 8,6 Tage

**Tabelle 8: Überlebenswahrscheinlichkeit nach Fasudilbehandlung (Männchen). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.**

### 3.4.3 Ergebnisse der Y-27632 - Behandlung der Weibchen

Der *Cox hazard test* ergibt für den Vergleich der Überlebenszeiten von mit 2 mg/kgKG/d Y-27632 behandelten Weibchen mit der Wasserkohorte, die sämtliche Werte der Kontrollkohorte für die Fasudilbehandlung einschließt, einen p-Wert von 0,448 (Abbildung 6). Die durchschnittliche Überlebensdauer der Kontrolltiere beträgt 132,8 ± 8,0 Tage. Der Mittelwert des Überlebens der Y-27632 behandelten Tiere liegt bei 130,4 ± 8,8 Tage (Tabelle 9). In der Verumgruppe findet sich ein Tier mit dem Minimalwert von 113 Lebenstagen. Der Abstand zum zweitkürzesten Überleben eines

Weibchens dieser Kohorte beträgt 10 Tage. In der Kontrollgruppe liegt der Minimalwert bei 119 Tagen.

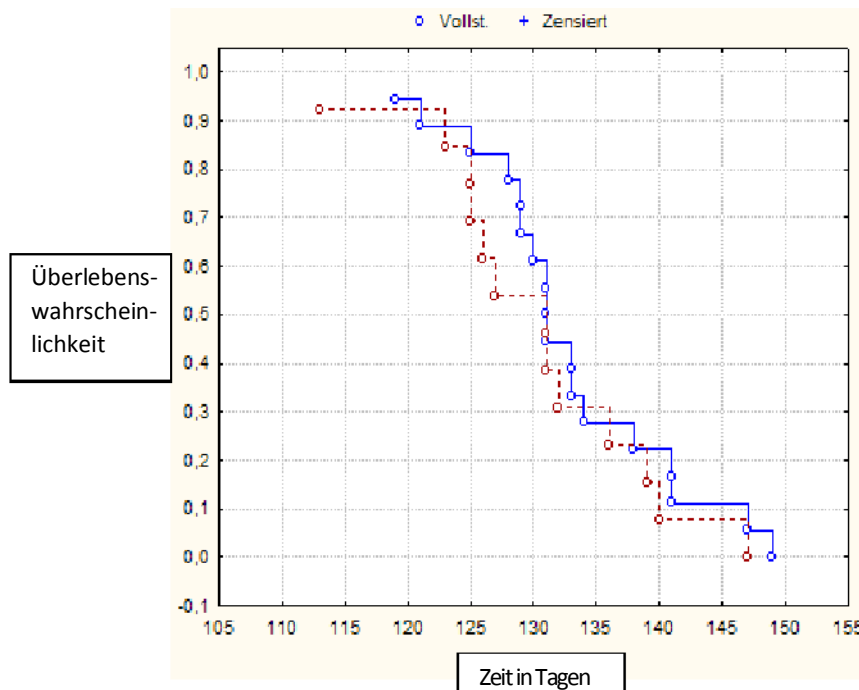


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve für die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Y-27632-Behandlung (Weibchen). Blau: Vehicle (n =18), dunkelrot: 2 mg/kg/KG/d Y-27632 (n =13), p = 0,448 (Cox hazard).

Versuchsgruppen	Vehicle	Y-27632
Weibchen	132,8 ± 8,0 Tage	130,4 ± 8,8 Tage

Tabelle 9: Überlebenswahrscheinlichkeit nach Y-27632-Behandlung (Weibchen). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung

### 3.4.4 Ergebnisse der Y-27632 - Behandlung der Männchen

Der *Cox hazard test* ergibt für den Vergleich der mit 2 mg/kg/KG/d Y-27632 behandelten Männchen mit der Gruppe sämtlicher männlicher Kontrolltiere einen p-Wert von 0,969 (Abbildung 7). Der Mittelwert der Kontrollgruppe liegt bei  $125,9 \pm 7,3$  Tage. Der Unterschied zum Mittelwert der mit Y-27632 behandelten Tiere beträgt 0,8 Tage, da die durchschnittliche Lebenszeit der Verumkohorte bei  $126,7 \pm 6,8$  Tage liegt (Tabelle 10).

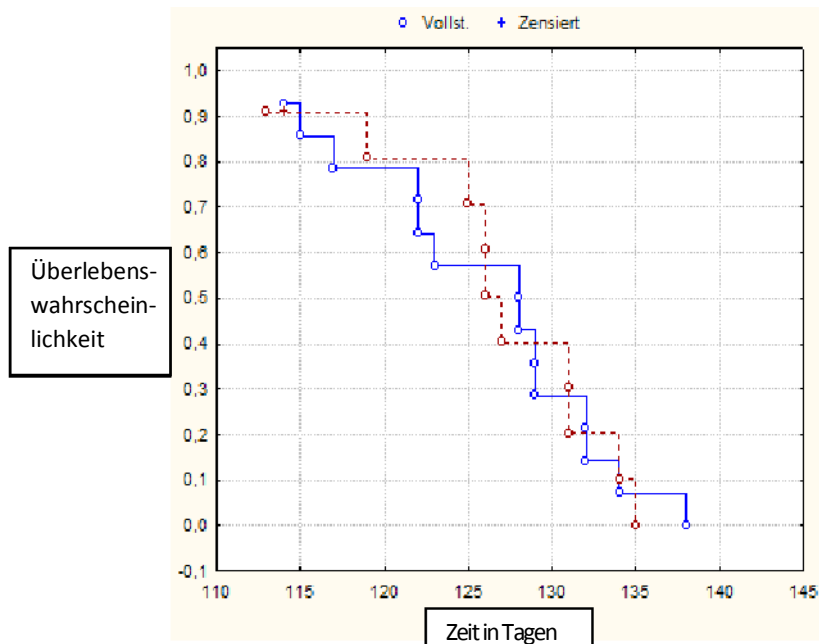


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve für die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Y27632-Behandlung (Männchen). Blau: Vehicle (n =14), dunkelrot: 2 mg/kgKG/d Y-27632 (n =10), p = 0,969 (Cox hazard).

Versuchsgruppen	Vehicle (blau)	Y-27632 (dunkelrot)
Männchen	125,9 ± 7,3 Tage	126,7 ± 6,8 Tage

Tabelle 10: Überlebenswahrscheinlichkeit nach Y-27632 Behandlung (Männchen). Die Werte in der Tabelle sind Mittelwert ± Standardabweichung.

### 3.5 Beginn klinischer Symptomatik

#### 3.5.1 Ergebnisse der Fasudilbehandlung der Weibchen

Der klinische Erkrankungsbeginn SOD1-(G93A)-transgener Weibchen wird im Vergleich zur Kontrolle weder durch eine ab dem 50. Lebensstag startende Behandlung mit 30 mg/kgKG/d noch durch eine am gleichen Tag beginnende Applikation durch Behandlung mit 100 mg/kgKG/d signifikant verändert (p-Wert = 0,388 im Cox hazard test) (Abbildung 8). Der Symptombeginn liegt in der Kontrollgruppe bei  $96,3 \pm 9,4$  Tagen. Die Mittelwerte für den durchschnittlichen klinischen Erkrankungsbeginn der Verumgruppen liegen bei 100,1 Tagen  $\pm 7,1$  Tage für *Fasudil low* und für *Fasudil high* bei  $101,0 \pm 5,9$  Tagen (Tabelle 11). Zwischen den kleinsten fünf Werten der Kontrollgruppe mit zweimal 83 und dreimal 86 Tagen liegt ein 12 bzw. 15 tägiger Abstand zum nächst höheren gemessenen Wert von 98 Tagen. In allen drei Kohorten erkrankten mehrere Weibchen am 101. Lebensstag. Im Einzelnen sind dieses in der



Kontrollgruppe vier Tiere, in der Fasudil 30 mg/kgKG/d Kohorte fünf Mäuse und in der mit Fasudil 100 mg/kgKG/d behandelten Gruppe sogar acht Tiere.

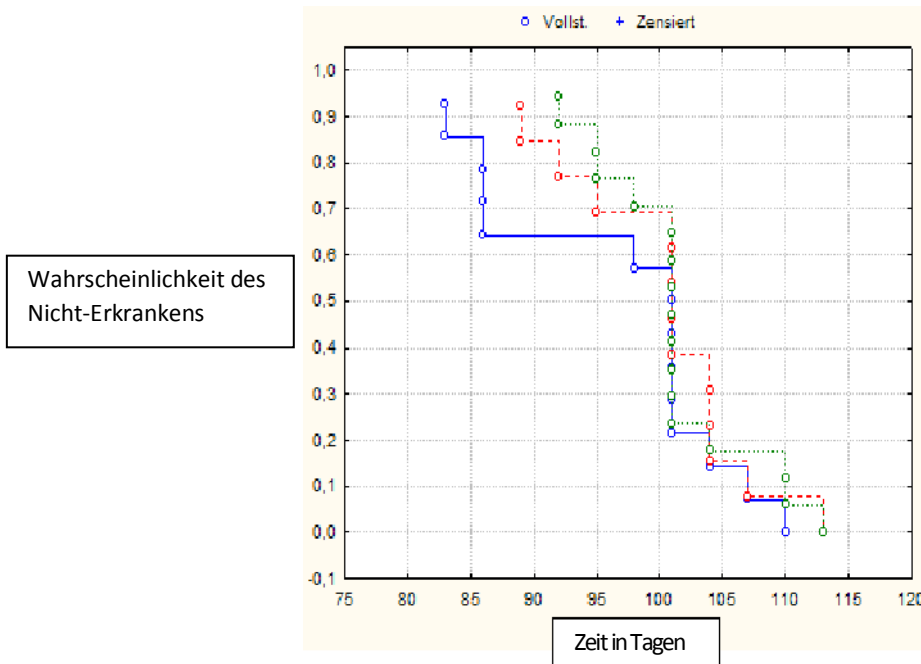


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Fasudilbehandlung (Weibchen). Blau: *Vehicle* (n=14), rot: *Fasudil low* (n=13), grün: *Fasudil high* (n=17), p = 0,388 (Cox hazard).

Versuchsgruppen	<i>Vehicle</i>	<i>Fasudil low</i>	<i>Fasudil high</i>
Weibchen	96,3 ± 9,4 Tage	100,1 ± 7,1 Tage	101,0 ± 5,9 Tage

Tabelle 11: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Fasudilbehandlung (Weibchen). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

### 3.5.2 Ergebnisse der Fasudilbehandlung der Männchen

Der p-Wert für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens für den Vergleich der mit Fasudil behandelten Männchen und der Kontrollgruppe liegt bei p = 0,787 (Abbildung 9). Der Mittelwert der Kontrollgruppe ist mit 97,2 ± 6,7 Tage 1,6 Tage größer als der Mittelwert der *Fasudil low*-Gruppe mit 95,6 ± 8,0 Lebenstagen. Der Mittelwert der *Fasudil high*-Gruppe liegt mit 94,3 ± 10,0 Tagen 2,9 Lebenstage unter dem Mittelwert der Kontrollgruppe (Tabelle 12).

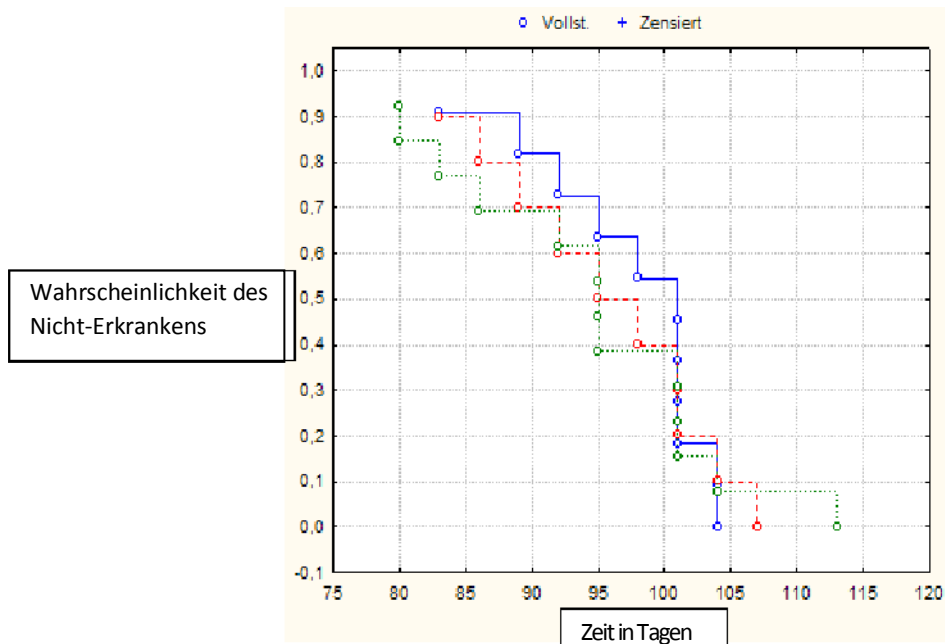


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Fasudilbehandlung (Männchen). Blau: *Vehicle* (n =11), rot: *Fasudil low* (n =10), grün: *Fasudil high* (n=13), p = 0,787 (*Cox hazard*).

Versuchsgruppen	<i>Vehicle</i>	<i>Fasudil low</i>	<i>Fasudil high</i>
Männchen	97,2 ± 6,7 Tage	95,6 ± 8,0 Tage	94,3 ± 10,0 Tage

Tabelle 12: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Fasudilbehandlung (Männchen). Angegeben sind Mittelwert ± Standardabweichung.

### 3.5.3 Ergebnisse der Y-27632-Behandlung der Weibchen

Die Mittelwerte des klinischen Erkrankungsbeginns betragen für die weibliche Y27632 Kohorte  $105,4 \pm 4,2$  Lebenstage und für die Kontrollgruppe  $96,8 \pm 9,9$  Tage. Es ergibt sich hierdurch eine Differenz zwischen den Mittelwerten von 8,6 Tagen (Tabelle 13). Der Unterschied zwischen den Kohorten im durchgeführten *Cox hazard test* ist mit einem p-Wert von 0,063 nicht signifikant. Während der Maximalwert beider Gruppen bei 110 Lebenstagen liegt, ist der Unterschied zwischen den Minimalwerten der Kontrollkohorte von 80 Lebenstagen und der Verumgruppe von 98 Lebenstagen mit 18 Tagen deutlich ausgeprägt (Abbildung 10).

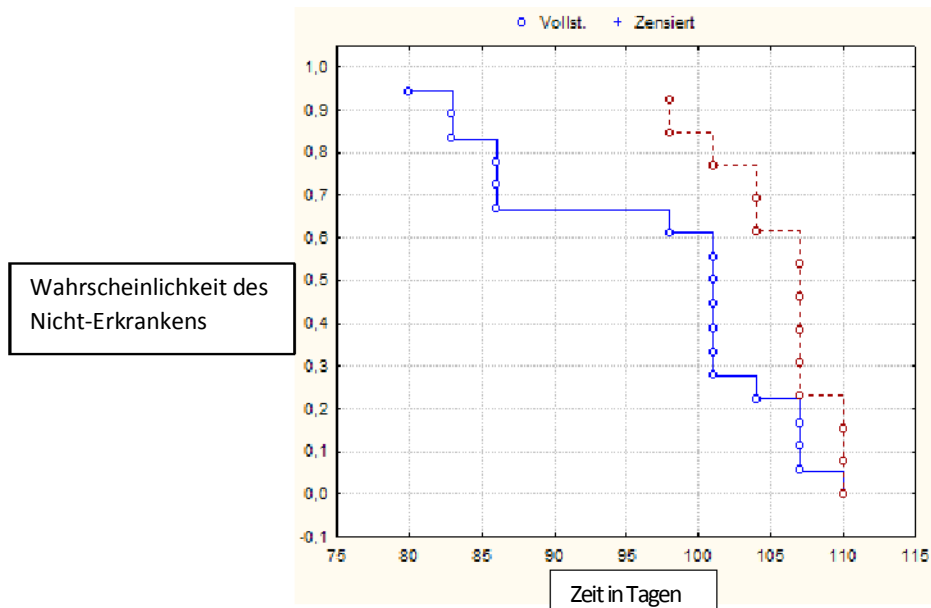


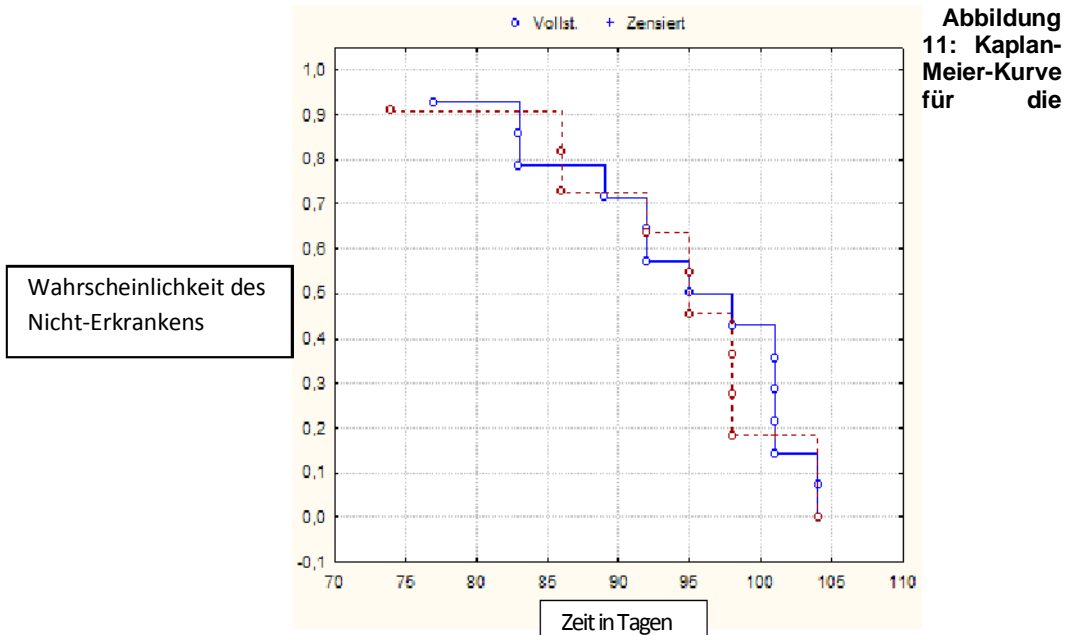
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Y-27632-Behandlung (Weibchen). Blau: *Vehicle* (n =18), dunkelrot: 2 mg/kgKG/d Y-27632 (n =13), p = 0,063 (*Cox hazard*).

Versuchsgruppen	<i>Vehicle</i>	Y-27632
Weibchen	96,8 ± 9,9 Tage	105,4 ± 4.2 Tage

Tabelle 13: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Y27632-Behandlung (Weibchen). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

### 3.5.4 Ergebnisse der Y-27632-Behandlung der Männchen

Bei den Männchen findet sich im Vergleich der 2 mg/kgKG/d Y-27632 Kohorte mit der Wasserguppe ein p-Wert von 0,833 (*Cox hazard test*) (Abbildung 11). Die Mittelwerte für den klinischen Erkrankungsbeginn der Y-27632 Kohorte und der Kontrollkohorte liegen bei  $92,6 \pm 8,6$  Tagen bzw.  $94,4 \pm 8,7$  Tagen (Tabelle 14). Der späteste Symptombeginn einer Maus ist mit 104 Tagen für beide Kohorten identisch. Zwischen dem frühesten klinischen Erkrankungsbeginn der Y-27632-Kohorte mit 74 Tagen und dem zweit niedrigsten Wert dieser Gruppe von 86 Tagen besteht eine Differenz von 12 Lebenstagen.



Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Y-27632-Behandlung (Männchen). Blau: *Vehicle* (n =14), dunkelrot: 2 mg/kgKG/d Y-27632 (n =10), p = 0,833 (Cox hazard).

Versuchsgruppen	<i>Vehicle</i>	Y-27632
Männchen	94,4 ± 8,7 Tage	92,6 ± 8,6 Tage

Tabelle 14: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Erkrankens nach Y-27632-Behandlung (Männchen). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

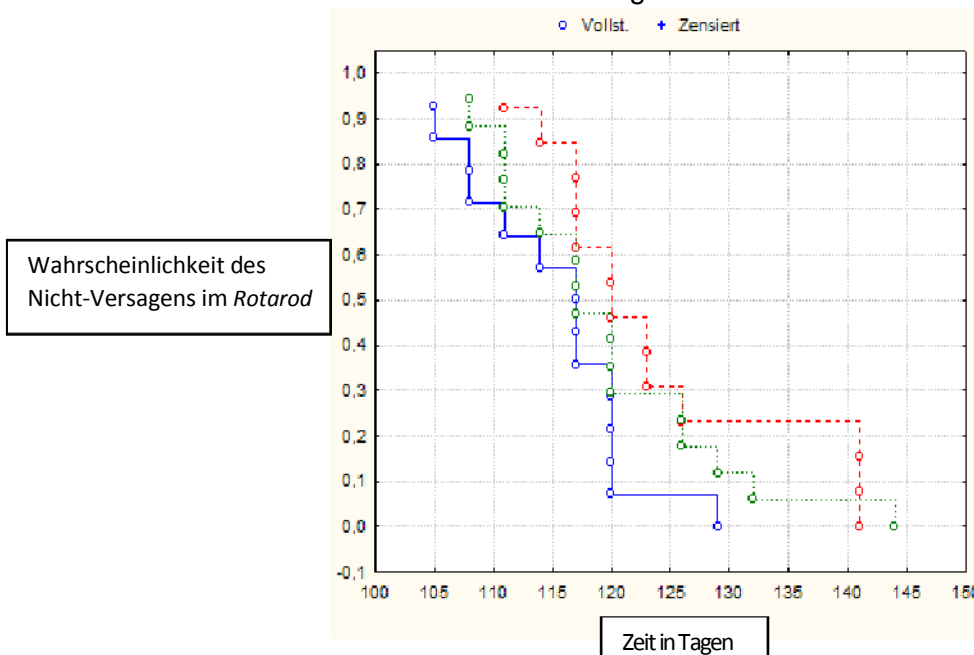
### 3.6 Verhaltensexperimente

#### 3.6.1 Drehwalzentest (*Rotarod*)

##### 3.6.1.1 Ergebnisse der Fasudilbehandlung der Weibchen

Im Vergleich der Trinkwasserkohorte mit den *Fasudil low* und *Fasudil high* behandelten Weibchen ergibt sich ein p-Wert von 0,280 (Cox hazard test). Ein direk-ter Vergleich der Wasserkohorte mit der *Fasudil low*-Kohorte zeigt einen signifikanten Unterschied im Cox hazard test (p = 0,0495) (Abbildung 12). Der Mittelwert der *Fasudil low*-Kohorte beträgt 123,9 Tage ± 10,5 Tage. Es ergibt sich eine Differenz von 8,8 Tagen zum Mittelwert der Kontrollgruppe von 115,1 ± 6,9 Lebenstagen (Tabelle 15). Die Minimalwerte der drei weiblichen Kohorten liegen mit 105 (*Vehicle*), 108 (*Fasudil high*) und 111 (*Fasudil low*) relativ nahe beieinander. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch der *Fasudil high* Kohorte finden sich mit 9 (*Vehicle*) bezieh-ungsweise 12 Tagen (*Fasudil high*) deutliche Abstände zwischen dem Maximalwert von 129 Tagen der Kontrollkohorte beziehungsweise 144

Tagen der mit 100 mg/kgKG/d Fasudil behandelten Mäuse und dem jeweils zweitspätesten Wert des Herunterfallens im Drehwalzentest von 120 Tagen (*Vehicle*) und 132 Lebenstagen (*Fasudil high*). In der Kohorte der mit 30 mg/kgKG/d behandelten Weibchen finden sich drei Tiere mit dem Maximalwert von 141 Lebenstagen des erstmaligen Nicht-erreichens der vollen 180 Sekunden als Tageswert im Tretmühlentest. Zwischen diesen und dem nächstniedrigeren Wert dieser Kohorte von 126 Tagen besteht eine Differenz von 15 Lebenstagen.



**Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im Rotarod (< 100% = < 180 Sekunden) nach Fasudilbehandlung (Weibchen). Blau: *Vehicle* (n =14), rot: *Fasudil low* (n =13), grün: *Fasudil high* (n=17), p (alle) = 0,28 (Cox hazard), p (Vergleich blau mit rot) = 0,0495 (Cox hazard)**

Versuchsgruppen	<i>Vehicle</i>	<i>Fasudil low</i>	<i>Fasudil high</i>
< 100 %	115,1 ± 6,9 Tage	123,9 ± 10,5 Tage	119,5 ± 9,6 Tage
< 80 %	115,7 ± 6,5 Tage	124,4 ± 10,9 Tage	119,7 ± 9,5 Tage
< 20 %	120,0 ± 5,9 Tage	127,6 ± 11,9 Tage	122,7 ± 8,8 Tage

**Tabelle 15: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im Rotarod nach Fasudilbehandlung (Weibchen). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Rotarod < 80% (< 144 Sekunden). p = 0,354 (Cox hazard) und Rotarod < 20% (< 36 Sekunden) p = 0,567 (Cox hazard).**

### 3.6.1.2 Ergebnisse der Fasudilbehandlung der Männchen

Im *Cox hazard test* ergibt sich für den Vergleich der mit Fasudil behandelten Männchen mit der Kontrollkohorte für das erstmalige Nichterreichen von 180 Sekunden (100%) im Drehwalzentest ein p-Wert von 0,528 (Abbildung 13). Die Mittelwerte der beiden Fasudilkohorten von  $108,6 \pm 8,3$  Tagen der Behandlung mit 30 mg/kgKG/d und von 108,7 Tagen mit einer Standardabweichung von 6,1 Lebens-tagen unterscheiden sich mit 0,1 Tagen nur marginal voneinander. Der Abstand zum Mittelwert der Kontrollgruppe von 106,4 Tagen beträgt für die *Fasudil low*-Kohorte 2,2 Tage beziehungsweise zum durchschnittlichen erstmaligen Nichterreichen des 100%igen Tageswertes im Drehwalzentest für die 100 mg/kgKG/d Kohorte 2,1 Lebenstage (Tabelle 16).

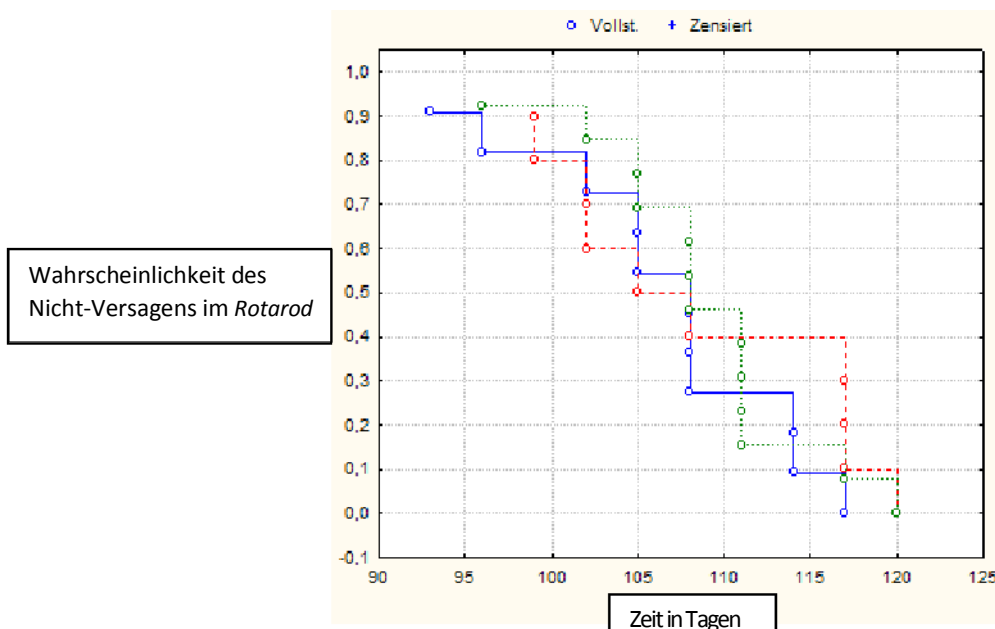


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Rotarod* (< 100% = < 180 Sekunden) Fasudilbehandlung (Männchen). Blau: *Vehicle* (n =11), rot: *Fasudil low* (n =10), grün: *Fasudil high* (n=13), *Rotarod* < 100% (< 180 Sekunden), p = 0,528 (*Cox hazard*).

Versuchsgruppen	<i>Vehicle</i>	<i>Fasudil low</i>	<i>Fasudil high</i>
< 100 %	106,4 ± 7,4 Tage	108,6 ± 8,3 Tage	108,7 ± 6,1 Tage
< 80 %	108,3 ± 5,8 Tage	110,4 ± 8,8 Tage	109,4 ± 6,6 Tage
< 20 %	111,8 ± 5,7 Tage	112,8 ± 8,5 Tage	117,2 ± 5,4 Tage

Tabelle 16: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Rotarod* nach Fasudilbehandlung (Männchen). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. *Rotarod* < 80% (< 144 Sekunden), p = 0,794 (*Cox hazard*), *Rotarod* < 20% (< 36 Sekunden) p = 0,096 (*Cox hazard*).

### 3.6.1.3 Ergebnisse der Y-27632-Behandlung der Weibchen

Der Vergleich des Zeitpunktes des erstmaligen Nichterreichens eines Tageswertes von 180 Sekunden im Drehwalzentest (100%), zwischen den mit 2 mg/kgKG/d behandelten Weibchen und der Kontrollkohorte ergibt im *Cox hazard test* einen p-Wert von 0,475 (Abbildung 14). Der Mittelwert der Verumgruppe beträgt hierbei  $115,4 \pm 6,3$  Lebenstage. Da der Mittelwert der Kontrollgruppe bei  $116,8 \pm 10,6$  Tage liegt, besteht zwischen dem durchschnittlichen erstmaligen Auftretens eines Tageswertes von unter 100% im Drehwalzentest zwischen beiden Kohorten ein Unterschied von nur 1,4 Tagen (Tabelle 17).

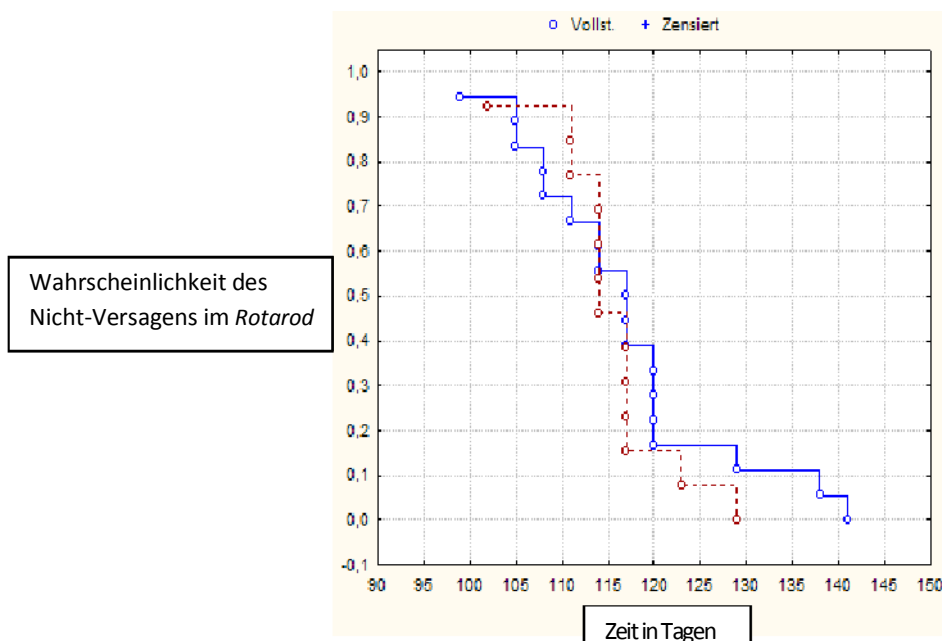


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Rotarod* (< 100% = < 180 Sekunden) nach Y-27632-Behandlung (Weibchen). Blau: *Vehicle* (n =18), dunkelrot: 2 mg/kgKG/d Y-27632 (n =13), *Rotarod* <100% (< 180 Sekunden) p = 0,475 (*Cox hazard*).

Versuchsgruppen	<i>Vehicle</i>	Y-27632
< 100 %	$116,8 \pm 10,6$ Tage	$115,4 \pm 6,3$ Tage
< 80 %	$117,5 \pm 11,0$ Tage	$115,9 \pm 6,3$ Tage
< 20 %	$121,3 \pm 10,2$ Tage	$118,6 \pm 7,6$ Tage

Tabelle 17: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Rotarod* nach Y-27632-Behandlung (Weibchen). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. *Rotarod* < 80% (< 144 Sekunden) p = 0,495 (*Cox hazard*), *Rotarod* < 20% (< 36 Sekunden) p = 0,262 (*Cox hazard*).

### 3.6.1.4 Ergebnisse der Y-27632-Behandlung der Männchen

Der Unterschied des erstmaligen Nichterreichens eines Tageswertes von 100% im Drehwalzentest beträgt zwischen den mit 2 mg/kgKG/d Y-27632 behandelten Männchen im Vergleich zur Kontrollgruppe 1,8 Tage und ist mit einem p-Wert von 0,318 im *Cox hazard test* nicht signifikant (Abbildung 15). Der Mittelwert der Kontrollgruppe beträgt  $106,5 \pm 6,9$  Lebenstage und für die Verumkohorte ergibt sich ein Mittelwert von  $108,3 \pm 8,7$  Tagen. In der Analyse des erstmaligen Nichterreichens eines Tageswertes von 80% bzw. 20% ergeben sich mit p - Werten im *Cox hazard test* von 0,432 bzw. 0,457 ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten (Tabelle 18).

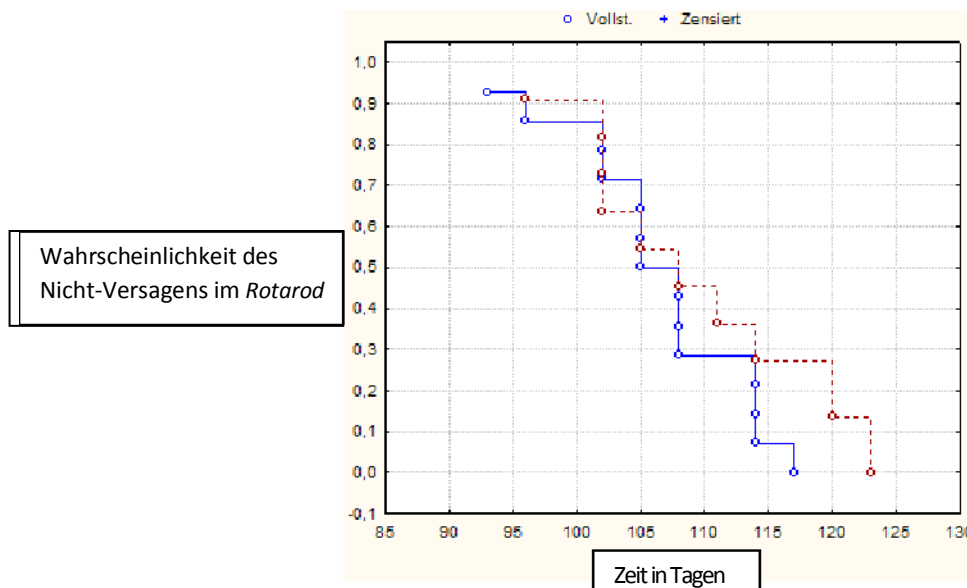


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Rotarod* (< 100% = < 180 Sekunden) nach Y-27632-Behandlung (Weibchen). Blau: *Vehicle* (n =14), dunkelrot: 2 mg/kgKG/d Y-27632 (n =10), p = 0,318 (*Cox hazard*).

Versuchsgruppen	<i>Vehicle</i>	Y-27632
< 100 %	106,5 ± 6,9 Tage	108,3 ± 8,7 Tage
< 80 %	108,0 ± 5,6 Tage	108,9 ± 8,1 Tage
< 20 %	111,2 ± 5,9 Tage	111,9 ± 8,0 Tage

Tabelle 18: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Rotarod* nach Y-27632-Behandlung (Männchen). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. *Rotarod* < 80% (< 144 Sekunden) p = 0,432 (*Cox hazard*), *Rotarod* < 20% (< 36 Sekunden) p = 0,457 (*Cox hazard*).



### 3.6.2 Gitterhängetest (*Hanging wire*)

#### 3.6.2.1 Ergebnisse der Fasudilbehandlung der Weibchen

Der Unterschied des Zeitpunktes des erstmaligen Nichterreichens eines Tageswertes von 180 Sekunden (100 %) im Gitterhängetest ist zwischen den mit Fasudil behandelten Weibchen und der Kontrollkohorte mit einem p-Wert von 0,591 (*Cox hazard test*) nicht signifikant (Abbildung 16). Der Mittelwert, der nur mit Wasser behandelten Kontrollkohorte, beträgt  $105,3 \pm 8,9$  Tage. Mit einem Wert von  $107,9 \pm 10,4$  Tage des durchschnittlichen erstmaligen Nichterreichens eines Tageswertes von 100% im Gitterhängetest, unterscheidet sich die mit 30 mg/kgKG/d Fasudil behandelte Gruppe nur 0,7 Lebenstage vom Mittelwert der mit 100 mg/kgKG/d Fasudil behandelten Kohorte von  $108,6 \pm 7,7$  Tagen. Mit 92 beziehungsweise 122 Lebenstagen sind sowohl der Minimal- als auch der Maximalwert der drei Kohorten identisch. Der Vergleich des Nichterreichens eines Tageswertes von  $\geq 144$  Sekunden bzw.  $\geq 36$  Sekunden im Gitterhängetest ergibt in der weiteren Analyse ebenfalls keine Signifikanzen (Tabelle 19).

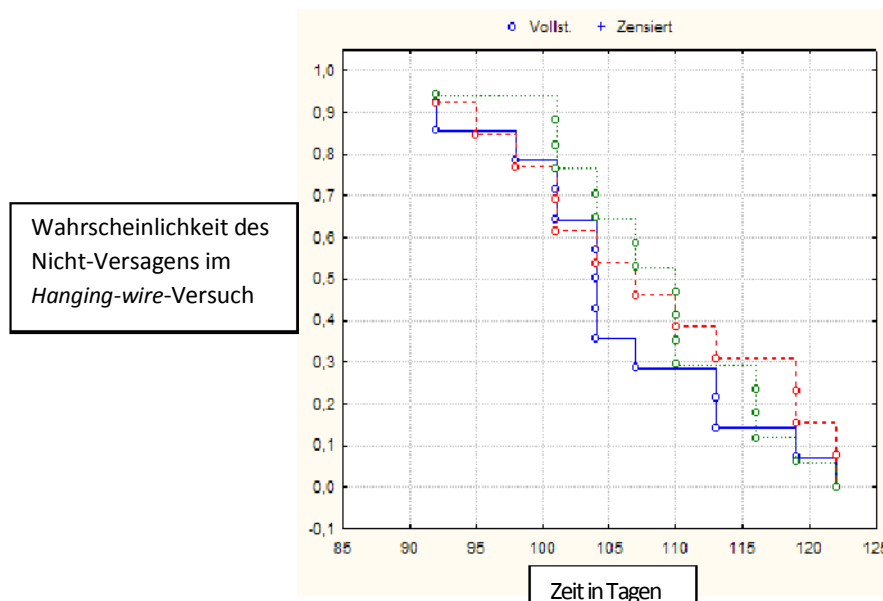


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Hanging-wire*-Versuch ( $< 100\% = < 180$  Sekunden) nach Fasudilbehandlung (Weibchen). Blau: *Vehicle* ( $n = 14$ ), rot: *Fasudil low* ( $n = 13$ ), grün: *Fasudil high* ( $n = 17$ ). Gitterhängetest  $< 100\%$  ( $< 180$  Sekunden)  $p = 0,591$  (*Cox hazard*).

Versuchsgruppen	Vehicle	Fasudil low	Fasudil high
< 100 %	105,3 ± 8,9 Tage	107,9 ± 10,4 Tage	108,6 ± 7,7 Tage
< 80 %	106,8 ± 9,5 Tage	109,8 ± 9,6 Tage	109,1 ± 7,8 Tage
< 20 %	117,5 ± 6,9 Tage	119,5 ± 7,7 Tage	118,5 ± 7,4 Tage

Tabelle 19: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Hanging-wire*-Versuch nach Fasudilbehandlung (Weibchen). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Gitterhängetest < 80% (< 144 Sekunden),  $p = 0,845$  (Cox hazard). Gitterhängetest < 20% (< 36 Sekunden),  $p = 0,699$  (Cox hazard).

### 3.6.2.2 Ergebnisse der Fasudilbehandlung der Männchen

Im *Cox hazard test* findet sich im Vergleich der mit Fasudil behandelten Männchen mit der Kontrollkohorte ein  $p$ -Wert von 0,162. Der Unterschied des Mittelwertes des erstmaligen Nichterreichens eines Tageswertes von 180 Sekunden im Gitterhänge-test der *Fasudil low*-Kohorte von 95,6 Lebenstagen ± 8,8 Tage beträgt zum Mittelwert der Kontrollkohorte 3,3 Tage. Der Mittelwert der Kontrollgruppe beträgt 92,3 ± 7,5 Tage. Dieses ist im Vergleich zum durchschnittlichen erstmaligen Nichterreichens eines Tageswertes von 100% im Gitterhängetest der *Fasudil high*-Kohorte von 86,2 ± 5,4 Tage ein Unterschied von 6,1 Tagen (Abbildung 17 und Tabelle 20). Der Trend zu einem signifikanten Unterschied zwischen der mit 30 mg/kgKG/d und 100 mg/kgKG/d Fasudil behandelten Kohorte ist in der weitergehenden Analyse des erstmaligen Nichterreichens eines Tageswertes von < 20% im Gitterhängetest aufgehoben.

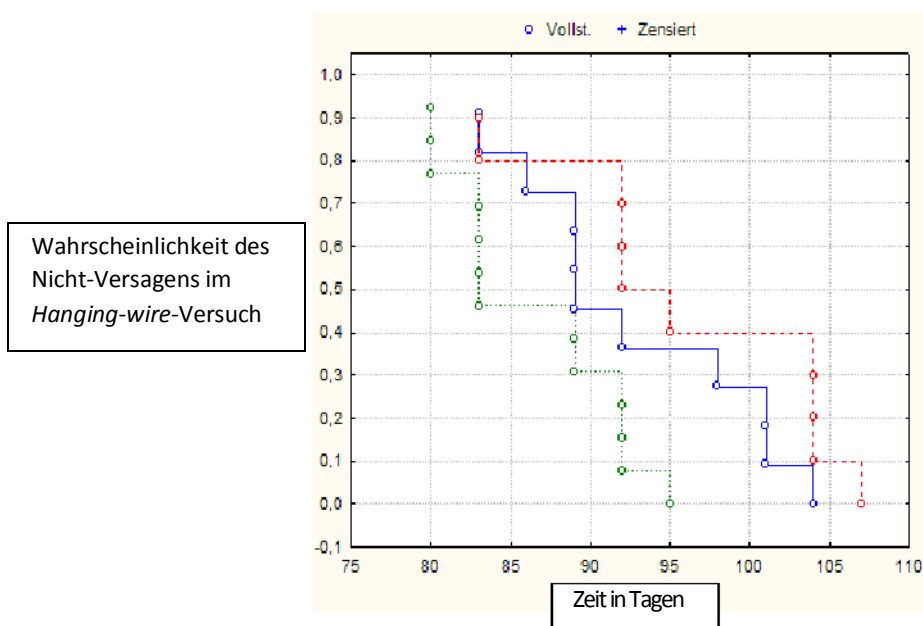


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Hanging-wire*-Versuch (< 100% = < 180 Sekunden) nach Fasudilbehandlung (Männchen). Blau: *Vehicle* (n =11), rot: *Fasudil low* (n =10), grün: *Fasudil high* (n=13).  $p = 0,162$  (Cox hazard).

Versuchsgruppen	<i>Vehicle</i>	<i>Fasudil low</i>	<i>Fasudil high</i>
< 100 %	92,3 ± 7,5 Tage	95,6 ± 8,8 Tage	86,2 ± 5,4 Tage
< 80 %	95,3 ± 8,8 Tage	95,6 ± 8,8 Tage	87,6 ± 6,3 Tage
< 20 %	107,3 ± 10,2 Tage	107,6 ± 5,1 Tage	102,4 ± 9,5 Tage

**Tabelle 20: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Hanging-wire*-Versuch nach Fasudilbehandlung (Männchen). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Gitterhängetest < 80% (< 144 Sekunden), p (alle) = 0,047 (*Cox hazard*) p (Vergleich zwischen *Vehicle* und *Fasudil high*) = 0,052 (*Cox hazard*). Gitterhängetest < 20% (< 36 Sekunden), p = 0,170 (*Cox hazard*).**

### 3.6.2.3 Ergebnisse der Y-27632-Behandlung der Weibchen

Mit einem p-Wert von  $p = 0,869$  (*Cox hazard test*) ist der Unterschied des erstmaligen Nichterreichens eines Tageswertes von 180 Sekunden (100%) im Gitterhängetest zwischen den mit 2 mg/kgKG/d behandelten Tieren und allen Kontrollweibchen dieser Studie nicht signifikant (Abbildung 18). Hierbei beträgt der Mittelwert der Kontrollkohorte  $105,7 \pm 11,5$  Tage. Für die Verumkohorte ergibt sich ein durchschnittliches erstmaliges Nichterreichen eines Tageswertes von 100% von  $109,3 \pm 6,8$  Tagen. Der Vergleich des erstmaligen Nichterreichens eines Tageswertes von 80% beziehungsweise 20% ergibt mit p-Werten von  $p = 0,929$  bzw.  $p = 0,806$  Tagen im *Cox hazard test* ebenfalls statistisch nicht signifikante Unterschiede (Tabelle 21).

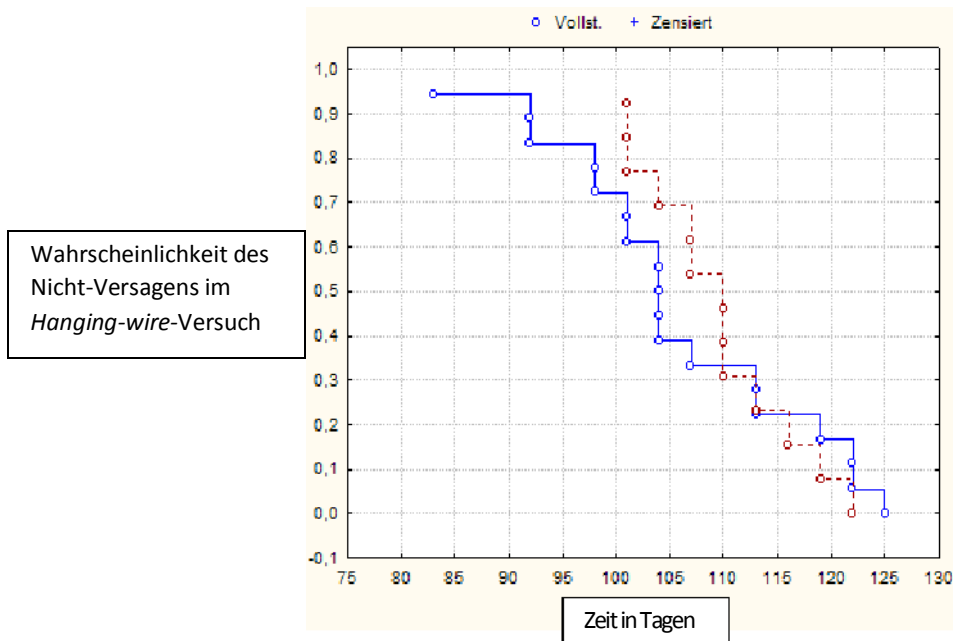


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Hanging-wire*-Versuch (< 100% = < 180 Sekunden) nach Y-27632-Behandlung (Weibchen). Blau: *Vehicle* (n =18), dunkelrot: 2 mg/kg/KG/d Y-27632 (n =13). Gitterhängetest < 100% (< 180 Sekunden), p = 0,869 (*Cox hazard*).

Versuchsgruppen	<i>Vehicle</i>	Y-27632
< 100 %	105,7 ± 11,5 Tage	109,3 ± 6,8 Tage
< 80 %	107,2 ± 12,0 Tage	110,5 ± 6,7 Tage
< 20 %	119,3 ± 11,0 Tage	121,1 ± 6,2 Tage

Tabelle 21: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Hanging-wire*-Versuch nach Y-27632-Behandlung (Weibchen). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Gitterhängetest < 80% (< 144 Sekunden), p = 0,929 (*Cox hazard*). Gitterhängetest < 20% (< 36 Sekunden), p = 0,806 (*Cox hazard*).

### 3.6.2.4 Ergebnisse der Y-27632-Behandlung der Männchen

Der Unterschied für das erstmalige Nichterreichen des Tageswertes von 180 Sekunden (100%) im Gitterhängetest ergibt zwischen den mit 2 mg/kgKG/d behandelten Männchen und allen mit Trinkwasser behandelten männlichen Kontrolltieren ein statistisch nicht-signifikantes Ergebnis im *Cox hazard test* (p = 0,52). Der Mittelwert der Kontrollgruppe beträgt 88,6 ± 11,0 Tage. Hieraus ergibt sich eine Differenz von 1,6 Lebenstagen zu dem Mittelwert der Verumkohorte von 90,2 ± 9,5 Tagen. In der Verumkohorte findet sich ein zensiertes Tier mit einem Wert von 101 Tagen (Abbildung 19 und Tabelle 22).

Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Hanging-wire*-Versuch

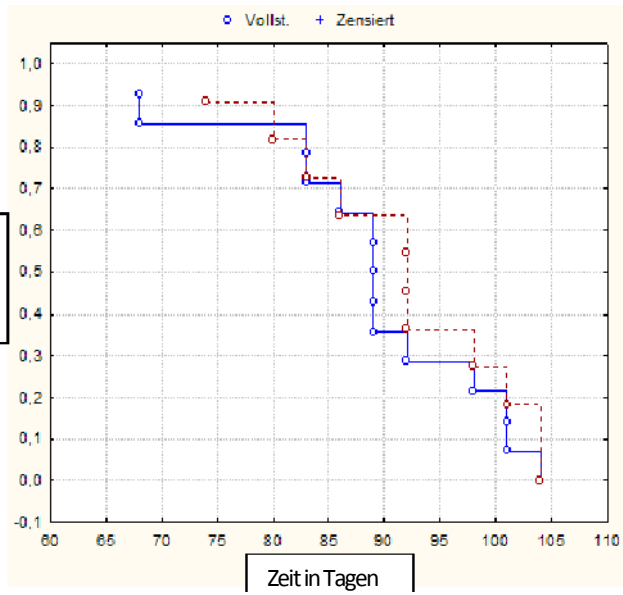


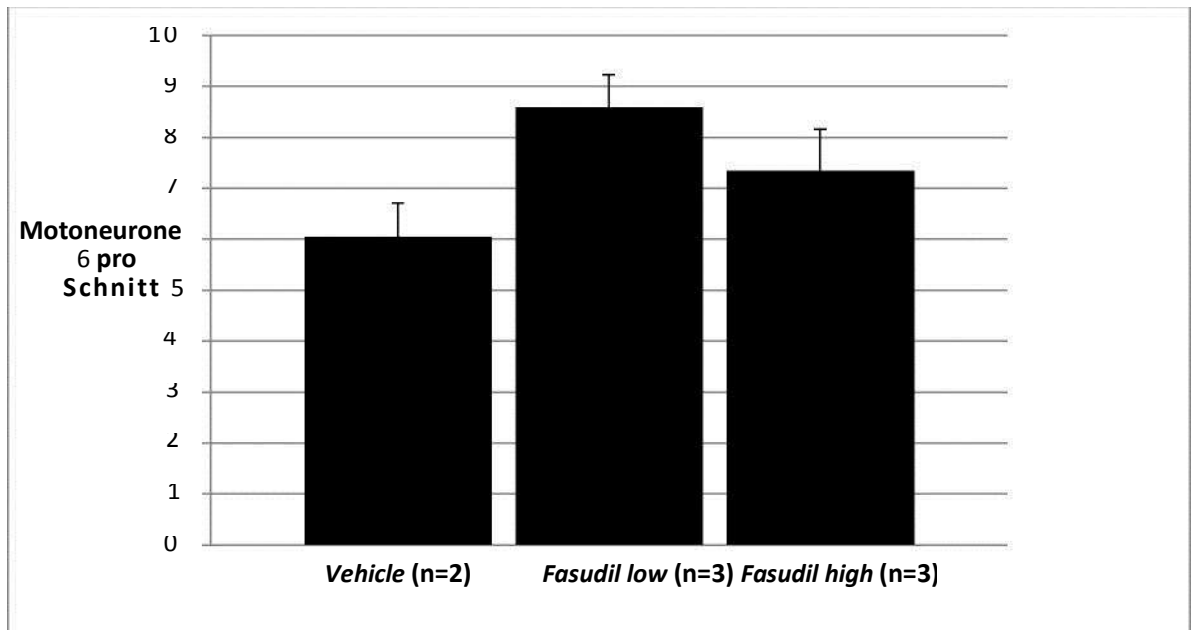
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurve für die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Hanging-wire*-Versuch (< 100% = < 180 Sekunden) nach Y-27632-Behandlung (Männchen). Blau: *Vehicle* (n =14), dunkelrot: 2 mg/kgKG/d Y-27632 (n =10). Gitterhängetest < 100% (< 180 Sekunden), p = 0,520 (*Cox hazard*).

Versuchsgruppen	<i>Vehicle</i>	Y-27632
< 100 %	88,6 ± 11,0 Tage	90,2 ± 9,5 Tage
< 80 %	90,9 ± 12,5 Tage	90,2 ± 9,5 Tage
< 20 %	104,9 ± 10,8 Tage	102,8 ± 9,6 Tage

Tabelle 22: Wahrscheinlichkeit des Nicht-Versagens im *Hanging-wire*-Versuch nach Y-27632-Behandlung (Männchen). Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Gitterhängetest < 80% (< 144 Sekunden), p = 0,794 (*Cox hazard*). Gitterhängetest < 20% (< 36 Sekunden), p = 0,713 (*Cox hazard*).

### 3.7 Immunhistochemie und Quantifizierung der Motoneuronanzahl

Im Vergleich mit der Kontrollkohorte mit durchschnittlich 6,1 Motoneuronen pro Cryoschnitt finden sich bei mit *Fasudil low* behandelten Weibchen mit 8,6 Motoneuronen pro Cryoschnitt mehr Motoneurone im jeweiligen Vorderhornabschnitt je-



doch ohne ein signifikantes Unterschiedsniveau zu erreichen (Abbildung 20).

Abbildung 20: Anzahl von ChAT-positiven Zellen im Vorderhornbereich pro Cryoschnitt

## 4 Diskussion

### 4.1 Präsymptomatische Behandlung mit Fasudil (30 mg/kgKG/d) verlängert das Überleben bei Weibchen

In der Zusammenschau der Überlebensdaten der einzelnen Kohorten im SOD1(G93A)-Mausmodell zeigt sich ein signifikant längeres Überleben in der mit 30 mg/kgKG/d Fasudil behandelten weiblichen Kohorte im Vergleich zur Trinkwasserkontrollgruppe. Alle weiteren Überlebensanalysen waren nicht signifikant. Dass bei gleicher Dosisapplikation die Weibchen, nicht jedoch die Männchen in der Fasudilkohorte von 30 mg/kgKG/d länger leben, ist möglicherweise auf eine additive Wirkung des Östrogens mit Fasudil zurückzuführen. Die höhere Dosis des Fasudils (100 mg/kgKG/d) führte nicht zu einem Überlebensvorteil im Vergleich zur niedrigeren Dosis (30 mg/kgKG/d). Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist, dass es sich bei Fasudil um ein Molekül handelt, welches viele Proteinkinasen neben der Rho-Kinase inhibiert. Bei höherer Dosis (100 mg/kgKG/d) ist somit davon auszugehen, dass auch andere Kinasen beeinflusst werden, wodurch die positive Wirkung der eher selektiven ROCK-Inhibition wieder aufgehoben wird (Davies et al. 2000). Aufgrund von *In-vitro*-Untersuchungen vermuten wir, dass es bei Fasudil zu einer U-förmigen Dosis-Wirkungsbeziehung kommt (Lingor et al. 2007). Es ist zu vermuten, dass eine Dosis von 100 mg/kg KG/d oberhalb des therapeutischen Fensters bei SOD1(G93A)-Mäusen liegt. Bei dieser Dosis könnte die Hemmung unspezifischer Kinasen den Vorteil der ROCK-Inhibition antagonisiert haben. Für die Ergebnisse der Y-27632-Studie liegt 2 mg/kgKG/d jedoch möglicherweise unterhalb des therapeutischen Bereichs.

Ein Unterschied im klinischen Verlauf und Überleben ist zwischen Männchen und Weibchen beim SOD1G93A-Mausmodell in der Literatur mehrfach belegt (Scott et al. 2008). Choi und Mitarbeiter fanden einen signifikant verzögerten Erkrankungsbeginn mit 16,5 Wochen bei SOD1(G93A)-transgenen Weibchen im Vergleich zu Männchen mit 16 Wochen (Choi et al. 2008). Das mittlere Überleben war bei den Weibchen mit  $135 \pm 1,3$  Tagen gegenüber den Männchen mit  $125 \pm 1,3$  Tagen signifikant verlängert und auch die motorische Leistungsfähigkeit im Drehwalzentest war bei den Weibchen länger vorhanden als bei SOD1(G93A)-transgenen Männchen. Dieser Geschlechtsunterschied wird von manchen Autoren auf den neuroprotektiven Effekt von Östrogenen zurückgeführt (Choi et al. 2008). So zeigte eine Östrogenbehandlung nach Ovariectomie einen unveränderten Erkrankungsbeginn der SOD1(G93A)-transgenen Weibchen, jedoch war das Überleben bei ovariectomierten Mäusen ohne Hormonersatztherapie mit  $129 \pm 1,5$  Tagen im Vergleich zur Gruppe mit Ovariectomie

und Östrogensersatztherapie von  $137 \pm 2$  Tagen signifikant verkürzt. Der Drehwalzentest (*Rotarod*) zeigte keine signifikanten Unterschiede (Choi et al. 2008).

Östrogene haben einen anti-inflammatorischen und neuroprotektiven Effekt in vielen ZNS-Erkrankungen (Liu et al. 2013). Im Rattenmodell der experimentellen Autoimmunenzephalitis konnte gezeigt werden, dass Östrogen signifikant die ROCK-II-Expression herunterreguliert (Liu et al. 2013) und in Neuroblastomzellen vermochte Östrogen die RhoA-Aktivität zu senken (Takahashi et al. 2011).

In einem Mausmodell der Hypertension wirken Androgene vasokonstriktiv über eine Hochregulation des Rho-Kinase-Signalweges (Song et al. 2006). Militello und Mitarbeiter fanden ein signifikantes verringertes freies Testosteron im Serum bei ALS-Patienten bei im Vergleich zur Kontrollgruppe gleichbleibendem Gesamttestosteron, 17-Betaestradiol und Dehydroepiandrosterone (Militello et al. 2002). Aufgrund der Wirksamkeit der Geschlechtshormone auf die Rho-Kinase-Aktivität gehen wir davon aus, dass insbesondere die Anwesenheit von Östrogenen die ROCK-Inhibition verstärkt und somit nur die Weibchen signifikant von einer ROCK-Inhibition mit den von uns gewählten Testmethoden in messbarem Ausmaß profitierten. Weitergehende Untersuchungen sind sinnvoll, um die geschlechtsspezifischen Effekte besser erklären zu können.

#### **4.2 Einfluss der ROCK-Inhibition auf den klinischen Erkrankungsbeginn**

Beim klinischen Erkrankungsbeginn zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede, obwohl dieser Test einen sehr validen Untersuchungsparameter darstellt. Trotz des längeren Überlebens bei der Fasudil 30 mg/kgKG/d-Weibchen-Kohorte zeigt sich bei dieser Kohorte keine Verzögerung im klinischen Krankheitsbeginn. Es ist wahrscheinlich, dass diese Befunde mit dem Beginn der Behandlung am 50. Lebensstag zusammenhängen und ein früherer Beginn der ROCK-Inhibitorgabe signifikante Ergebnisse ergibt, da zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns bereits histologisch eine Schädigung der Axone nachgewiesen werden konnte (Fischer et al. 2004).

#### **4.3 Verbesserte Koordination durch Fasudil (30 mg/kgKG/d) bei den Weibchen**

Im Drehwalzentest (*Rotarod*) ergab sich bei den Weibchen ein signifikant besseres Abschneiden der *Fasudil low*-Kohorte im Vergleich zur Trinkwassergruppe. Alle weiteren Drehwalzentestanalysen waren ohne statistisch signifikante Ergebnisse. Das Ergebnis bei den mit *Fasudil low* behandelten Weibchen deckt sich mit einem längeren Überleben in dieser Kohorte. Somit untermauert das Drehwalzentestergebnis den positiven Effekt der Fasudil-Applikation bei den Weibchen, die ab dem



50. Tag mit 30 mg/kgKG/d behandelt wurden. Durch Analyse des Drehwalzentests können Rückschlüsse auf den motorischen Funktionsstatus der Mäuse gezogen werden. Kraft und Koordination sind für ein artgerechtes Bewegungs- und Sozialverhalten von Nagern außergewöhnlich wichtig. So waren diese Tiere auch weniger auf Unterstützung bei der Nahrungsaufnahme angewiesen. Im übertragenen Sinne wäre auch in Bezug auf ALS-Patienten eine Verlängerung der Phase der Selbstversorgung durch Fasudilbehandlung zu hoffen.

Die Analyse der Gitterhängetestergebnisse (*Hanging wire*) zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede. Grund hierfür ist möglicherweise, dass der Gitterhängetest nicht so sensitiv für kleinere motorische Leistungsunterschiede wie der Drehwalzentest ist und die erzielten Effekte somit nicht durch den Gitterhängetest detektierbar waren.

#### **4.4 Mehr Motoneurone bei mit Fasudil (30 mg/kgKG/d) behandelten Weibchen**

Im Vergleich mit der Trinkwasserkohorte finden sich bei mit *Fasudil low* behandelten Weibchen mehr Motoneurone pro Schnitt. Somit zeigt sich nicht nur ein klinischer sondern auch morphologischer positiver Effekt. Aufgrund der zeitintensiven Etablierung der Rückenmarksentnahmetechnik und der immunhistochemischen Färbungen, konnte nur eine kleine Stichprobenanzahl der weiblichen Tiere gewonnen werden. Deshalb ergibt sich auch keine Signifikanz. Eine weitergehende Analyse der männlichen Tiere konnte nicht stattfinden und ist in Zukunft sehr sinnvoll, um die Effekte der ROCK-Inhibition besser untersuchen zu können.

Neben den vielfältigen dargestellten proregeneratorischen Effekten spielt die Rho-kinase-Inhibition auch unmittelbar bei der Verminderung von Apoptose eine wichtige Rolle. So vermochte eine zweimalige Fasudilapplikation von 10 mg/kg/i.p. nach einer und sechs Stunden in einem murinen Modell der Rückenmarksläsion unter anderem die Apoptose, gemessen durch FAS-Ligand-, Bax- und Bcl-2-Expression, im Vergleich zur Kontrolle zu verringern (Impellizzeri et al. 2012). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass eine Rho A-Inhibition nach Rückenmarksläsion p75NTR abhängige Apoptose reduziert (Dubreuil et al. 2003). Darüber hinaus zeigte sich bei retinalen Ganglienzellen ein vermehrtes Überleben durch ROCK-Inhibition in einem Läsionsmodell des Sehnerven (Bermel et al. 2009). Es ist davon auszugehen, dass die Rho-ROCK-Signalkaskade auch für das Überleben adulter spinaler Motoneurone wichtig ist. Im MPTP-Mausmodell der Parkinsonerkrankung zeigte die Behandlung mit Y-27632 eine signifikante Reduktion von MPTP-induzierter mikroglialer Aktivierung und einen verminderten Zelltod dopaminerger Neurone (Villar-Cheda et al. 2012). Die in der *Fasudil low*-Gruppe bei den Weibchen gesehene vermehrte Anzahl ChAT-

positiver Zellen unterstützt zusätzlich die Hypothese anti-apoptischer Potenz des Fasudils im SOD1(G93A)-Mausmodell der ALS. Hierbei korrelieren die immun-histochemischen Resultate mit den klinischen Befunden. So zeigt sich bei der *Fasudil high*-Gruppe auch histologisch kein statistisch signifikanter Unterschied.

#### **4.5 Translationale Forschung**

Da bei der ALS verschiedene ätiologische Faktoren angenommen werden, wurden auch eine Vielzahl von Therapieoptionen mit verschiedenen therapeutischen Ansätzen mit u.a. anti-glutamaterger, anti-oxidativer oder anti-inflammatorischer Wirkung in SOD1-Mausmodellen getestet (Turner und Talbot 2008). Von den über 150 Studien, die vornehmlich im SOD1-(G93A)-Mausmodell durchgeführt wurden, sollen hier einige beispielhaft aufgeführt werden. Hierbei ist hervorzuheben, dass trotz einiger überzeugender Ergebnisse unterschiedlicher Substanzen im Mausmodell bis heute allein Riluzol den Sprung in die klinische Anwendung gefunden hat. Neben dem anti-glutamaterg wirkenden Riluzol (50 mg/kgKG/d Riluzol im Trinkwasser ab dem 50.Lebenstag), welches das Überleben im SOD1-(G93A)-Modell im Vergleich zur Kontrollgruppe um zirka 10% verlängerte, wurden unter anderem Gabapentin und Memantine aufgrund ihrer anti-glutamatergen Wirkkomponente im Mausmodell getestet (Mitsumoto et al. 2014; Turner und Talbot 2008). Mit der Applikation dieser Wirkstoffe wurde wie bei Riluzol bereits vor Symptombeginn begonnen. Gabapentin konnte in Form einer 3%igen Futterbeimischung ab dem 50. Lebensstag weder den Zeitpunkt des Auftretens erster Symptome noch die Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe verändern. Die ab dem 70. Lebensstag alle 2 Tage durchgeführte subkutane Injektion von 10 mg/kgKG Memantine vermochte die Überlebenszeit der mit Verum behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrolle um 7% verlängern. Aber auch hier trat keine Verzögerung des Krankheitsausbruches auf. Als Beispiele für antioxidativ wirkende Substanzen, die bisher im ALS-Mausmodell getestet wurden, finden sich beispielsweise Kreatin und Ascorbinsäure, wobei die präsymptomatische Gabe (hier Lebensstag 70) von Kreatin in Form einer 1,2%igen Futterbeimischung das Überleben bis zu 18% im Vergleich zur unbehandelten Gruppe verlängern konnte. Dieses ist in der Gesamtschau aller bisherigen Studien im ALS-Mausmodell überdurchschnittlich (Turner und Talbot 2008). So konnte eine ab dem 50. Lebensstag gegebene 0,8%ige Beimengung von Ascorbinsäure das Überleben der Verumgruppe in einer anderen Studie um 8% steigern. Eine ab dem 28. Lebensstag beginnende anti-inflammatorische Therapie mit Celecoxib verlängerte das Gesamtüberleben der behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle sogar um 25% (Turner und Talbot 2008). Somit stellt auch der anti-inflammatorische Ansatz

eine potentielle mögliche Therapieoption bei ALS dar. Insgesamt erzielten Substanzkombinationen im Schnitt bessere Effekte als Monotherapien. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die gleichzeitige Beeinflussung multipler Signalkaskaden eine effektivere Möglichkeit der Therapieintervention bei der ALS darstellt. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass eine der Signalkaskaden, die in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen, die Rho/ROCK-Kaskade ist.

#### 4.6 Studienaufbau

Die entscheidende Bedeutung eines adäquaten Studienaufbaus für eine hinreichende Aussagekraft präklinischer ALS-Studien ist in mehreren Publikationen eindrücklich erwähnt worden und führte zu Empfehlungen für ein gutes Studiendesign, das den Effekt von Störvariablen auf die Versuchsergebnisse möglichst minimiert (Ludolph et al. 2007; Scott et al. 2008). Eine große Metaanalyse mit zusätzlichen - unter den in den initialen Veröffentlichungen beschriebenen Versuchsparemtern und mit mehreren zunächst als signifikant erfolgreich getesteten Substanzen - durchgeführten Wiederholungen einiger in der Literatur beschriebener Studien, die auch Riluzol mit einschloss, bestätigte den großen Einfluss methodischer Mängel auf die Studienergebnisse und im *retest* war keines der initial signifikanten Ergebnisse reproduzierbar (Scott et al. 2008). Dieses könnte auf einen zwar vorhandenen, aber nicht ausreichend starken und deshalb in der Überlebensanalyse und den Ergebnissen der Verhaltensexperimente der Mäuse nicht detektierbaren, therapeutischen Effekt zurückzuführen sein. Als Grund hierfür kann die Variabilität im SOD1-(G93A)-Mausmodell, infolge dessen ein eventuell bestehender zu geringer therapeutischer Effekt überstrahlt wird, genannt werden (Scott et al. 2008).

Aufgrund der Etablierung des SOD1-(G93A)-Mausmodells und der damit verbundenen nur langsam möglichen Expansion der Mäusekolonie, erstreckte sich der Versuchszeitraum, an dem täglich Verhaltensversuche an den Mäusen durchgeführt wurden, über mehr als neun Monate. Da statistisch nur 50% der Nachkommen transgen und somit für die Versuche nutzbar waren und zusätzlich regelmäßig neue transgene Zuchtböcke für die Weiterführung der Verpaarungen benötigt wurden, verlangsamte sich insbesondere die Gewinnung männlicher Versuchstiere, sodass sich auch im Vergleich der männlichen und weiblichen Fasudilkohorten eine kleine Zeitversetzung ergibt. Es wurde strikt darauf geachtet, das von Ludolph und Mitarbeiter (2007) geforderte Versuchsdesign einzuhalten und die Versuchstiere eines Wurfes und gleichen Geschlechts unterschiedlichen Kohorten zuzuordnen (*litter matched*). Hierbei konnten jedoch nicht alle Kohorten komplett parallel getestet werden, sodass zunächst je drei weibliche und drei männliche Kohorten für die Testung von Fasudil

30 mg/kgKG/d, 100 mg/kgKG/d und Wasser starteten. Der Einschluss erster mit Y-27632 (2 mg/kgKG/d) behandelte Tiere erfolgte nach dem Start der Fasudilkohorten. Deshalb wurde die Statistik der unterschiedlichen ROCK-Inhibitor-Behandlungen von Fasudil und Y-27632 jeweils separat durchgeführt.

#### 4.7 Bedeutung nicht-neuronaler Zellen für Krankheitsentstehung und –progredienz der ALS

Die Bedeutung nicht-neuronaler Zellen für Krankheitsentstehung und -progredienz der ALS wurde insbesondere auch durch Studien mit experimenteller selektiver Expression von mSOD1 in einzelnen Zellpopulationen belegt. So führt eine Expression von mSOD1 ausschließlich in  $\alpha$ -Motoneuronen nicht zur ALS. Auch die alleinige Expression von mSOD1 in Astrozyten oder Mikroglia ist für sich genommen nicht ausreichend, um das bei der ALS auftretende selektive Motoneuronsterben zu initiieren. Vielmehr ist für einen klassisch ablaufenden Motoneuronverlust bei der ALS das gleichzeitige Vorhandensein von mSOD1 in allen drei Zellpopulationen essentiell (Lobsiger und Cleveland 2007). Im Krankheitsverlauf finden sich bei der ALS eine reaktive Vermehrung und Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten (Philipps und Robberecht, 2011). Somit sind neben den Motoneuronen selbst auch Astrozyten sowie Mikrogliazellen wichtige Ansatzpunkte künftiger Behandlungsstrategien. Auch die Modulation der Zytokin- und Chemokinfreisetzung durch aktivierte Mikroglia kann hierbei eine wichtige Rolle spielen (Lobsiger und Cleveland 2007; Sargsyan et al. 2005, Sargsyan et al. 2009).

Bei der ALS findet sich eine erhöhte Rate mSOD1-exprimierender aktivierter Mikroglia (Turner et al. 2004). Diese besitzen veränderte Sezernierungseigenschaften. So wurde beispielsweise in einem ALS-Mausmodell ein erhöhter *Tumor necrosis factor-alpha*-Spiegel im Rückenmarksgewebe gefunden (Ghezzi et al. 1998), was einen weiteren Hinweis auf eine bei der ALS ablaufende Neuroinflammation darstellt. Auch Astrozyten sind an den pro-inflammatorischen Prozessen beteiligt. Jedoch ist die bei der ALS auftretende Immunreaktion nicht in jedem Fall neurotoxisch, sondern kann auch neuroprotektive Wirkung haben (Henkel et al. 2009). Diese endogene neuroprotektive Inflammation wird bei der ALS unter anderem durch ins zentrale Nervensystem einwandernde T-Lymphozyten gefördert (Chiu et al. 2008).

Bei kultivierten Rückenmarksastrozyten bewirkte ROCK-Inhibition eine vermehrte Proliferation (Yu et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass Fasudil den astrozytären Glutamatrezeptor EAAT1/2 in murinen Astrozytenkulturen hochreguliert, was der Glutamat-induzierten Exitotoxizität bei der ALS entgegenwirken kann (Lau et al. 2011). Durch Fasudilgabe wurde die *granulocyte colony stimulating factor-*

Produktion erhöht und neuronaler Zelltod vermindert (Ding et al. 2009). Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass durch ROCK-Inhibition aktivierte Astrozyten das Neuritenwachstum behindernde *chondroitin sulfate proteoglycan* sezernieren (Chan et al. 2007). Durch die systemische Gabe der ROCK-Inhibitoren wurden in der vorliegenden Studie auch Astrozyten und Mikroglia in ihren Sezernierungseigenschaften verändert. Zur besseren Erklärung der in dieser Studie gefundenen Ergebnisse ist die Analyse der Astrozyten und Mikroglia in mit ROCK-Inhibitoren behandelten Geweben sinnvoll.

#### **4.8 Wirkungen der ROCK-Inhibition auf die Vaskulatur**

Die Arbeit von Zhong und Mitarbeitern konnte zeigen, dass es bei der ALS schon deutlich vor dem Auftreten des Motoneurontods zu Veränderungen der Rückenmarksdurchblutung sowie einer Störung der Blut-Rückenmarkschranke kommt. So wurden bereits vor Auftreten des Motoneurontods unter anderem eine 10-15%ige Reduktion der Gesamtkapillarlänge im lumbalen Rückenmark mehrerer ALS-Mausmodelle sowie eine Minderperfusion der zervikalen und lumbalen Rückenmarksabschnitte von 30-45% bei zwei Monate alten SOD1(G93A)-Mäusen im Vergleich zu Wildtypkontrolltieren gefunden (Zhong et al. 2008). Die Hypothese eines Perfusionsdefizits bei der ALS wird durch die Studie von Waldemar und Mitarbeitern untermauert, die fokale zerebrale Hypoperfusionsareale bei ALS detektieren konnten. (Waldemar et al. 1992). Durch kalziumantagonistische Wirkung könnte Fasudil dieser Hypoperfusion entgegenwirken und die Sauerstoff- und Energieversorgung der Motoneurone verbessern. Somit könnten auch die Gefäßmodulatorischen Effekte des Fasudils zum Teil eine Erklärung der in dieser Studie gezeigten Ergebnisse liefern. Eine morphologische Untersuchung der Vaskulatur nach Fasudilbehandlung im ALS-Mausmodell ist sinnvoll, um die gezeigten Ergebnisse besser erklären zu können.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt eine präklinische Testung einer neuen medikamentösen Therapieoption der Amyotrophen Lateralsklerose durch Rho-Kinase-(ROCK)-Inhibitoren. Die Rho/ROCK-Signalkaskade stellt einen wichtigen Signaltransduktionsweg bei axonaler De- und Regeneration dar, der bereits in anderen neurodegenerativen Erkrankungen erfolgreich moduliert wurde. In der experimentellen Studie wurde im SOD1(G93A)-Mausmodell der ALS in verschiedenen Kohorten mit den ROCK-Inhibitoren Fasudil und Y-27632 ab dem 50. Lebensstag der transgenen Mäusen unterschiedliche Behandlungsparadigmata durchgeführt. Der 50. Lebensstag der SOD1-G93A liegt in der klinisch präsymptomatischen Lebensphase der SOD1(G93A)-transgenen Tiere, an dem jedoch bereits axonale Degeneration vorliegt. In dieser *proof of principle*-Studie wurde evaluiert, ob die Behandlung mit ROCK-Inhibitoren einen positiven Einfluss auf die Lebensdauer und motorischen Funktionen der ALS-Mäuse hat. Die Studie wurde für den Untersucher verblindet durchgeführt und es erfolgten sowohl eine engmaschige regelmäßige neurologische Testung (*clinical score*) als auch Testungen der motorischen Funktionalität der Versuchstiere (*Rotarod*- und *Hanging-wire*-Test). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich bei den Weibchen bei einer ab Tag 50 mit 30 mg/kgKG/d Fasudil behandelten Kohorte ein signifikant längeres Überleben und ein signifikant verzögerter Abfall der motorischen Leistungsfähigkeit im *Rotarod*-Test. Der *Hanging-wire*-Test ergab keine statistischen Signifikanzen. Dieselbe Behandlung konnte bei männlichen Tieren nicht gleichartige Ergebnisse erzielen, ebenso wie eine Hochdosisbehandlung mit Fasudil 100 mg/kgKG/d. Die orientierende Analyse einer Behandlung mit einem alternativen ROCK-Inhibitor Y27632 mit 2 mg/kgKG/d ergab keine statistisch signifikant positiven Resultate. Die Medikation wurde von allen Untersuchungsgruppen gut vertragen. Insgesamt zeigt die vorliegende Analyse, dass eine Behandlung mit ROCK-Inhibitoren in optimierter Dosierung bei weiblichen Tieren einen signifikanten Vorteil in Bezug auf Überleben und motorische Funktionalität erzielen kann. Hierbei ist zu vermuten, dass sowohl Fasudil 100 mg/kgKG/d als auch Y-27632 2 mg/kgKG/d außerhalb des therapeutischen Bereichs bei der Behandlung im SOD1(G93A)-Mausmodell der ALS liegen. Als weitergehende Untersuchung ist neben einer Dosisoptimierung die Behandlung mit ROCK-Inhibitoren ab Symptombeginn im ALS-Mausmodell sinnvoll, da dies die klinische Realität beim Menschen näher abbildet. Eine humane klinische Anwendung von Fasudil könnte schnell in die Praxis umgesetzt werden, da die Substanz zur Behandlung von zerebralen Vasospasmen beim Menschen bereits in Japan und China zugelassen ist und somit ein Repurposing erfolgen könnte.

## **Danksagung**

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Lingor für die Überlassung des Promotionsthemas und bei Herrn Prof. Dr. Bähr, die in seinem Labor bestehende Infrastruktur für die Versuchsdurchführung genutzt haben zu dürfen. Herrn Prof. Dr. Tönges danke ich ebenso wie Herrn Prof. Dr. Lingor für die durchgehend exzellente Betreuung der vorliegenden Arbeit. Sie übernahmen eine wissenschaftliche Vorbildfunktion für mich und ich konnte viel durch die Anfertigung der vorliegenden Arbeit lernen! Frau Barski gilt mein Dank für die Ratschläge bei der Etablierung der PCR und der Immunhistochemie. Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Zentralen tierexperimentellen Einrichtung für die stets gute Zusammenarbeit. Ich danke Herrn Dr. Jung für die statistische Beratung. Ich danke den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Lingor für die Möglichkeit zum wissenschaftlichen Dialog und die gute Arbeitsatmosphäre. Ich danke meinem damaligen Vertrauensdozenten der Heinrich-Böll-Stiftung Herrn Prof. Dr. Miosge sowie Herrn PD Dr. Begemann für stets aufmunternde Worte. Ich bedanke mich zudem sehr herzlich bei der Universitätsmedizin Göttingen für das Gö4med-Forschungsstipendium, welches mir ein Vollzeitforschungssemester für die Durchführung der aufwendigen Tierversuche ermöglichte.

## **Lebenslauf**

In Online-Version gelöscht.



## 6 Literaturverzeichnis

Amano M, Chihara K, Nakamura N, Kaneko T, Matsuura Y, Kaibuchi K (1999): The COOH terminus of rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity. *J Biol Chem* 274,32418-32424

Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K (2010): Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67,545-554

Andrus PK, Fleck TJ, Gurney ME, Hall ED (1998): Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 71,2041-2048

Arimura N, Inagaki N, Chihara K, Ménager C, Nakamura N, Amano M, Iwamatsu A, Goshima Y, Kaibuchi K (2000): Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *J Biol Chem* 275,23973-23980

Armon C (2009): Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. *Neurology* 73,1693-8

Armon C, Kurland LT (1990): Classic and Western Pacific Amyotrophic Lateral Sclerosis: Epidemiologic Comparison. In Hudson (Hrsg.) *Amyotrophic Lateral Sclerosis Concepts in Pathogenesis and Etiology*. Univ Press, Toronto, 144-65

Arnold A, Edgren DC, Palladino VS (1953): Amyotrophic lateral sclerosis. Fifty cases observed on Guam. *J. Nerv Ment Dis* 117,135-9

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

Berlit P. (Hrsg.): *Klinische Neurologie*. 3., erweiterte und vollständig überarbeitete Auflage, Springer- Verlag Berlin u.a. 2011

Bermel C, Tönges L, Planchamp F, Weishaupt JH, Dietz GP, Bähr M, Lingor P (2009): Combined inhibition of Cdk5 and ROCK additively increase cell survival, but not the regenerative response in regenerating retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci* 42, 427-37

Bilsland LG, Sahai E, Kelly G, Golding M, Greensmith L, Schiavo G (2010): Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 20523-8

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

Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW (2006b): Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312, 1389-1392

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

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

Chan CC, Wong AK, Liu J, Steeves JD, Tetzlaff W (2007): ROCK inhibition with Y27632 activates astrocytes and increases their expression of neurite growth- inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans. *Glia* 55, 369-384

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

Chio A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G (2005): Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* 128, 451-3

Chiu IM, Chen A, Zheng Y, Kosaras B, Tsiftoglou SA, Vartanian TK, Brown RH Jr, Carroll MC (2008): T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 17913-8

Choi CI, Lee YD, Gwag BJ, Cho SI, Kim SS, Suh-Kim H (2008): Effects of estrogen on lifespan and motor functions in female hSOD1 G93A transgenic mice. *J Neurol Sci* 268, 40-47

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

Cudkowicz ME, McKenna-Yasek D, Sapp PE, Chin W, Geller B, Hayden DL, Schoenfeld DA, Hosler BA, Horvitz HR, Brown RH (1997): Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 41, 210-221

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000): Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351, 95-105

Ding J, Yu JZ, Li QY, Wang X, Lu CZ, Xiao BG (2009): Rho kinase inhibitor Fasudil induces neuroprotection and neurogenesis partially through astrocyte-derived G-CSF. *Brain Behav Immun* 23, 1083-8

DGN (2015): Amyotrophe Lateralsklerose (Motoneuronerkrankungen). Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Hrsg. v. der Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. Stand 1. Juni 2014.

[http://www.dgn.org/images/red\\_leitlinien/LL\\_2014/PDFs\\_Download/030001\\_DGN\\_LL\\_ALS.pdf](http://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2014/PDFs_Download/030001_DGN_LL_ALS.pdf)

(Zugriffsdatum: 21.10.2015)

Dohm CP, Kermer P, Bähr M (2008): Aggregopathy in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic implication. *Neurodegener Dis* 5, 321-38

Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, Kimura N, Cai H, Deng K, Gao Y et al. (2002): Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 35, 283-290

Dubreuil CI, Winton MJ, McKerracher I (2003): Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. *J Cell Biol* 162, 233-43

Duffy P, Schmandke A, Schmandke A, Sigworth J, Narumiya S, Cafferty WB, Strittmatter SM (2009): Rho-associated kinase II (ROCKII) limits axonal growth after trauma within the adult mouse spinal cord. *J Neurosci* 29, 15266-76

Elizan TS, Hirano A, Abrams BM, Need RL, Van Nuis C, Kurland LT (1966): Amyotrophic Lateral Sclerosis and Parkinsonism-Dementia Complex of Guam. *Neurological Reevaluation. Arch Neurol* 14, 356-368

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

Fleming JO, Ting JY, Stohlman SA, Weiner LP (1983): Improvements in obtaining and characterizing mouse cerebrospinal fluid: Application to mouse hepatitis virus-induced encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 4, 129-140

Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM (2003): Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci* 23, 1416-1423

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

Fukata Y, Oshiro N, Kinoshita N, Kawano Y, Matsuoka Y, Bennett V, Matsuura Y, Kaibuchi K (1999): Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility. *J Cell Biol* 145, 347-361

Gajdusek DC (1963): Motor-neuron disease in natives of New Guinea. *N Engl J Med* 268, 474-6

Gastl R, Ludolph AC (2007): Amyotrophe Lateralsklerose. *Nervenarzt* 78, 1449-1459

Ghezzi P, Bernardini R, Giuffrida R, Bellomo M, Manzoni C, Comoletti D, Di Santo E, Benigni F, Mennini T (1998): Tumor necrosis factor is increased in the spinal cord of an animal model of motor neuron degeneration. *Eur Cytokine Netw* 9, 139-44

Goshima Y, Nakamura F, Strittmatter P, Strittmatter SM (1995): Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* 376, 509-514

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

GüldenberG V, Zierz S, Dengler R, Jerusalem F (1994): Klinik und Differentialdiagnose. In: Dengler R., Zierz S., Jerusalem F. (Hrsg) Amyotrophe Lateralsklerose, Thieme Verlag, Stuttgart, 1994, 33-44

Günther R, Saal KA, Suhr M, Scheer D, Koch JC, Bähr M, Lingor P, Tönges L (2014): The rho kinase inhibitor Y-27632 improves motor performance in male SOD1(G93A) mice. *Front Neurosci* 8, 304

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

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

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

Hall A (1998): Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514

Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH (2009): Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J Neuroimmune Pharmacol.* 4, 389-98

Higgins CM, Jung C, Xu Z (2003): ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci* 4, 16

Higuchi R, Krummel B, Saiki RK (1988): A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 16, 7351-67

Hiraga A, Kuwabara S, Doya H, Kanai K, Fujitani M, Taniguchi J, Arai K, Mori M, Hattori T, Yamashita T (2006): Rho-kinase inhibition enhances axonal regeneration after peripheral nerve injury. *J Peripher Nerv Syst* 11, 217-24

Honjo M, Tanihara H, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue BY, Narumiya S, Honda Y (2001): Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 137-144

Horner RD, Kamins KG, Feussner JR, Grambow SC, Hoff-Lindquist J, Harati Y, Mitsumoto H, Pascuzzi R, Spencer PS, Tim R (2003): Occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War veterans. *Neurology* 61, 742-9

Hu E, Lee D (2003): Rho kinase inhibitors as potential therapeutic agents for cardiovascular diseases. *Curr Opin Inverstig Drugs* 4, 1065-1075

Huang L, Li Q, Li H, He Z, Cheng Z, Chen J, Guo L (2009): Inhibition of intracellular Ca<sup>2+</sup> release by a Rho-kinase inhibitor for the treatment of ischemic damage in primary cultured rat hippocampal neurons. *Eur J Pharmacol* 602, 238-44

Hufschmidt A, Lücking CH, Rauer S: *Neurologie compact: Für Klinik und Praxis*. 6. überarbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2013

Ichikawa M, Yoshida J, Saito K, Sagawa H, Tokita Y, Watanabe M (2008): Differential effects of two ROCK inhibitors, fasudil and Y-27632, on optic nerve regeneration in adult cats. *Brain Res* 1201, 23-33

Impellizzeri D, Mazzon E, Paterniti I, Esposito E, Cuzzocrea S (2012): Effect of fasudil, a selective inhibitor of Rho kinase activity, in the secondary injury associated with the experimental model of spinal cord trauma. *J Pharmacol Exp Ther* 343, 21-33

Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JA, Hawkins R, van Duijn W, Verspaget HW, London J, Holstege JC (2000): Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol Dis* 7, 623-43

Jacobs M, Hayakawa K, Swenson L, Bellon S, Fleming M, Taslimi P, Doran J (2006): The structure of dimeric ROCK I reveals the mechanism for ligand selectivity. *J Biol Chem* 281, 260-8

Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S Moolenaar WH (1994): Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol* 126, 801-810

Katoh H, Aoki J, Yamaguchi Y, Kitano Y, Ichikawa A, Negishi M (1998): Constitutively active Galpha12, Galpha 13, and Galphaq induce Rho-dependent neurite retraction through different signaling pathways. *J Biol Chem* 273, 28700-28707

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, 3241-50

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

Laferriere F, Polymenidou M (2015): Advances and challenges in understanding the multifaceted pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Swiss Med Wkly* 145, 14054

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

Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L (1996): The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 16, 5313-5327

Li M, Huang Y, Ma AA, Lin E, Diamond MI (2009): Y-27632 improves rotarod performance and reduces huntingtin levels in R6/2 mice. *Neurobiol Dis* 36, 413-20

Liao JK, Seto M, Noma K (2007): Rho Kinase (ROCK) Inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 50, 17-24

Ligriscino G, Travnor BJ, Hardiman O, Chio A, Mitchell D, Swingler RJ, Millul A, Benn E, Beghi E (2010): Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 385-390

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

Lingor P, Tönges L, Pieper N, Bermel C, Barski E, Planchamp V, Bähr M (2008): ROCK inhibition and CNTF interact on intrinsic signalling pathways and differentially regulate survival and regeneration in retinal ganglion cells. *Brain* 131, 250-263

Liu C, Li Y, Yu J, Feng L, Hou S, Liu Y, Guo M, Xie Y, Meng J, Zhang H (2013): Targeting the shift from M1 to M2 macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis mice treated with fasudil. *PLoS One* 8:e54841.doi: 10.1371/journal.pone

Lobsiger CS, Cleveland DW (2007): Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nat. Neurosci* 10, 1355-1360

Ludolph AC, Bendotti C, Blaugrund E, Hengerer B, Löffler JP, Martin J, Meininger V, Meyer T, Moussaoui S, Robberecht W (2007): Guidelines for the preclinical in vivo evaluation of pharmacological active drugs for ALS/MND: report on the 142nd ENMC international workshop Amyotroph Lateral Scler 8, 217-23

Maekawa M, Ishizaka T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S (1999): Signaling from rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895-898

Magrané J, Manfredi G (2009): Mitochondrial function, morphology, and axonal transport in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal* 11, 1615-1626

Maselli RA, Wollman RL, Leung C, Distad B, Palombi S, Richman DP, Salazar-Grueso EF, Roos RP (1993): Neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 16, 1193-203

Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996): Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* 15, 2208-16

Miana-Mena FJ, Muñoz 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



Militello A, Vitello G, Lunetta C, Toscano A, Maiorana G, Piccoli T, La Bella V (2002): The serum level of free testosterone is reduced in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 195, 67-70

Minase T, Ishima T, Itoh K, Hashimoto K (2010): Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by the ROCK inhibitor Y-27632: a possible role of IP<sub>3</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* 648, 67-73

Mitsumoto H, Brooks BR, Silani V (2014): Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved? *Lancet Neurol* 13, 1127-38

Miyazaki K, Nagai M, Morimoto N, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Abe K (2009): Spinal anterior horn has the capacity to self-regenerate in amyotrophic lateral sclerosis model mice. *J Neurosci Res* 87, 3639-48

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

Nagatoya K, Moriyama T, Kawada N, Takeji M, Oseto S, Murozono T, Ando A, Imai E, Hori M (2002): Y-27632 prevents tubulointerstitial fibrosis in mouse kidney with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 61, 1684-1695

Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S (1996): ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett* 392, 189-93

Neundörfer B: *Praxis der Amyotrophen Lateralsklerose*. UNIMED, Bremen 2002

Okamoto K, Mizuno Y, Fujita Y (2008): Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 28, 109-15

Oliveira AS, Pereira RD (2009): Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): three letters that change the people's life. For ever. *Arg Neuropsiquiatr* 67, 750-82

Olsen MF (2008): Applications for ROCK kinase inhibition. *Current Opinion in Cell Biol* 20, 242-248

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

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

Pitzer C, Krüger C, Plaas C, Kirsch F, Dittgen T, Müller R, Laage R, Kastner S, Suess S, Spoelgen R (2008): Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 13, 3335-3347

Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P (2006): Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 9, 408-19

Reyes NA, Fisher JK, Austgen K, VandenBerg S, Huang EJ, Oakes SA (2010): Blocking the mitochondrial apoptotic pathway preserves motor neuron viability and function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Invest* 120, 3673-9

Rikitake Y, Kim HH, Huang Z, Seto M, Yano K, Asano T, Moskowitz MA, Liao JK (2005): Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. *Stroke* 36, 2251-7

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 (1995): Excitotoxicity and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurosci* 3, 348-359

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

Sargsyan SA, Blackburn DJ, Barber SC, Monk PN, Shaw PJ (2009): Mutant SOD1 G93A microglia have an inflammatory phenotype and elevated production of MCP-1. *Neuroreport* 20, 1450-5

Sargsyan SA, Monk PN, Shaw PJ (2005): Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 51, 241-253

Satoh S, Kobayashi T, Hitomi A, Ikegaki I, Suzuki Y, Shibuya M, Yoshida J, Asano T (1999): Inhibition of neutrophil migration by a protein kinase inhibitor for the treatment of ischemic brain infarction. *Jpn J Pharmacol* 80, 41-8

Sau D, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L, Riso P, Guarnieri S, Porrini M, Simeoni S, Crippa V, Onesto E, Palazzolo I (2007): Mutation of SOD1 in ALS: a gain of a loss of function. *Hum Mol Genet* 16, 1604-18

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

Scott S, Kranz JE, Cole J, Lincecum 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, Ince PG, Falkous G, Mantle D (1995): Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol* 38, 691-695

Shibuya M, Hirai S, Seto M, Satoh S, Ohtomo E (2005): Effects of fasudil in acute ischemic stroke: results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *J Neurol Sci* 238, 31-39

Shimokawa H, Takeshita A (2005): Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1767-1775

Sieb JP, Schrank B: Neuromuskuläre Erkrankungen, Herausgegeben von Brandt TH, Hohlfeld R, Noth J, Reichmann H. 1. Auflage 2009 Verlag W. Kohlhammer

Song J, Kost CK Jr, Martin DS (2006): Androgens potentiate renal vascular responses to angiotensin II via amplification of the Rho kinase signaling pathway. *Cardiovasc Res* 72, 456-463

Song Y, Chen X, Wang LY, Gao W, Zhu MJ (2013): Rho kinase inhibitor fasudil protects against beta-amyloid-induced hippocampal neurodegeneration in rats. *CNS Neurosci Ther* 19, 603-610

Synofzik M, Fernández-Santiago R, Maetzler W, Schöls L, Andersen PM (2010): The human G93A SOD1 phenotype closely resembles sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 764-7

Takahashi K, Piao S, Yamatani H, Du B, Yin L, Ohta T, Kawagoe J, Takata K, Tsutsumi S, Kurachi H (2011): Estrogen induces neurite outgrowth via Rho family GTPases in neuroblastoma cells. *Mol Cell Neurosci* 48, 217-224

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

Talbot L, Marsden R (2008): *Motor neuron disease*, Oxford University Press.

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

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

Tönges L, Koch JC, Bähr M, Lingor P (2006): ROCKing regeneration: rho kinase inhibition as molecular target for neurorestoration. *Front Mol Neurosci* 4, 1-11

Traynor BJ, Alexander M, Corr B, Frost E, Hardiman O (2003): An outcome study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis--a population-based study in Ireland, 1996-2000. *J Neurol* 250, 473-479

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

Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB (2004): Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 15, 601-9

Tysnes OB, Vollset SE, Larsen JP, Aarli JA (1994): Prognostic factors and survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiol* 13, 226-35

Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E, Robberecht W (2006): The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Acta* 1762, 1068-82

Villar-Cheda B, Dominguez-Meijide A, Jogler B, Rodriguez-Perez AI, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2012): Involvement of microglial RhoA/Rho-kinase pathway activation in the dopaminergic neuron death. Role of angiotensin via angiotensin type 1 receptors. *Neurobiol Dis* 47, 268-79

Waldemar G, Vorstrup S, Jensen TS, Johnsen A, Boysen G (1992): Focal reductions of cerebral blood flow in amyotrophic lateral sclerosis: a [<sup>99m</sup>Tc]-d,l-HMPAO SPECT study. *J Neurol Sci* 107,19-28

Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z (2002): P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420, 74-78

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

Williamson TL, Cleveland DW (1999): Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* 2, 50-6

Wu D, Yang P, Zhang X, Luo J, Haque ME, Yeh J, Richardson PM, Zhang Y, Bo X (2009): Targeting a dominant negative rho kinase to neurons promotes axonal outgrowth and partial functional recovery after rat rubrospinal tract lesion. *Mol Ther* 17, 2020-30

Yamashita K, Kotani Y, Nakajima Y, Shimazawa M, Yoshimura S, Nakashima S, Iwama T, Hara H (2007): Fasudil, a Rho kinase (ROCK) inhibitor, protects against ischemic neuronal damage in vitro and in vivo by acting directly on neurons. *Brain Res* 1154, 215-24

Yang P, Wen HZ, Zhang JH (2010): Expression of a dominant-negative Rho-kinase promotes neurite outgrowth in a microenvironment mimicking injured central nervous system. *Acta Pharmacol Sin* 31, 531-9

Yu JZ, Ding J, Ma CG, Sun CH, Sun YF, Lu CZ, Xiao BG (2010): Therapeutic potential of experimental autoimmune encephalomyelitis by Fasudil, a Rho kinase inhibitor. *J Neurosci Res* 88, 1664-72

Yu Z, Liu M, Fu P, Xie M, Wang W, Luo X (2012): ROCK inhibition with Y27632 promotes the proliferation and cell cycle progression of cultured astrocyte from spinal cord. *Neurochem Int* 61, 1114-1120

Zhong Z, Deane R, Ali Z, Parisi M, Shapovalov Y, O'Banion MK, Stojanovic K, Sagare A, Boillée S, Cleveland DW (2008): ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat Neurosci* 11, 420-2

## **7 Internetquellen**

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01935518> A clinical trial of safety and efficacy of fasudil in subjects with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Zugriffsdatum: 21.10.2015

<http://jaxmice.jax.org> (Referenz für Primersequenzen). Zugriffsdatum: 14.03.2009