

Aus der Klinik für Neurologie

(Prof. Dr. med. M. Bähr)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Kombinationsbehandlung mit Fasudil und Riluzol im SOD1-G93A-  
Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Alexander Simon Balck**

aus

Lübeck

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. Kroemer  
Referent: Prof. Dr. med. P. Lingor  
Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. B. Reuss

Datum der mündlichen Prüfung: 11.04.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Kombinationsbehandlung mit Fasudil und Riluzol im SOD1-G93A-Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 15.12.2017

.....

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>II. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>III. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Die Krankheit Amyotrophe Lateralsklerose .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Epidemiologie .....</b>	<b>1</b>
<b>1.3. Klinisches Bild und Symptomatik .....</b>	<b>1</b>
<b>1.4. Diagnosestellung.....</b>	<b>2</b>
<b>1.5. Ätiologie und Pathogenese .....</b>	<b>3</b>
<b>1.6. Familiäre ALS-Formen.....</b>	<b>3</b>
1.6.1. SOD1 als genetische Grundlage der ALS.....	3
1.6.2. Genveränderungen im Spektrum von ALS und frontotemporaler Demenz (FTD).....	5
<b>1.7. Andere Risiko- und Protektionsfaktoren für ALS.....</b>	<b>8</b>
<b>1.8. Behandlungsstrategien von Amyotropher Lateralsklerose.....</b>	<b>8</b>
1.8.1. Riluzol in der Behandlung von ALS .....	8
1.8.2. Experimentelle Behandlungsansätze .....	9
<b>1.9. Experimentelle Methoden und Behandlungsansätze in Tiermodellen der ALS.....</b>	<b>10</b>
1.9.1. Das SOD-G93A-Mausmodell .....	10
1.9.2. Klinisches Erscheinungsbild und Überleben.....	11
1.9.3. Kognitive Leistungsfähigkeit.....	13
1.9.4. Der Novel Object Recognition Test (NOR-Test).....	13
1.9.5. Immunhistochemische Analysen des Zentralnervensystems (ZNS).....	14
1.9.6. Experimentelle Behandlungsansätze .....	14
<b>1.10. ROCK-Inhibition durch Fasudil in der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen .....</b>	<b>15</b>
1.10.1. Die Rho-Rock-Signalkaskade .....	15
1.10.2. Der ROCK-Inhibitor Fasudil .....	16
1.10.3. Auswirkungen von ROCK-Inhibition auf neuronale De- und Regeneration .....	16
1.10.4. ROCK-Inhibition im SOD-G93A-Mausmodell der ALS .....	16
<b>1.11. Zielsetzung der Arbeit und Studiendesign.....</b>	<b>17</b>
1.11.1. Hypothesen des Experiments.....	18
<b>2. Methodik und Material.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Standardmaterialien.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Versuchsgruppen .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3. Tierzucht und Mauslinie.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4. Die Genotypisierung .....</b>	<b>22</b>
<b>2.5. Tierhaltung und Applikation der Versuchssubstanzen.....</b>	<b>24</b>
<b>2.6. Bestimmung eines klinischen Punktesystems als Verlaufsparemeter der Erkrankung und des Überlebens.....</b>	<b>25</b>
2.6.1. Krankheitsbeginn und Beginn der schweren Erkrankung.....	26
2.6.2. Überleben und Versuchsende .....	27
<b>2.7. Klinisch funktionelle Testmethoden.....</b>	<b>27</b>
2.7.1. Drehwalzentest Rotarod .....	27
2.7.2. Ganganalyse-Test „Catwalk XT“ .....	28
2.7.2.1. Versuchsaufbau und Durchführung der Aufzeichnung des Gangbildes .....	28
2.7.2.2. Analyse des Gangbildes mit der Software Noldus Catwalk XT .....	30

2.7.2.3. Verwendete Parameter des Gangbildes.....	30
2.7.3. Novel Object Recognition Test.....	31
2.7.4. Bestimmung des Körpergewichts .....	34
<b>2.8. Immunhistologische Quantifizierung von <math>\alpha</math>-Motoneuronen im Rückenmark in einer Querschnittsstudie .....</b>	<b>34</b>
2.8.1. Entnahme und Präparation des Rückenmarks nach Günther et al. (2012).....	34
2.8.2. Immunhistochemische Darstellung der $\alpha$ -Motoneurone.....	36
2.8.3. Quantifizierung der $\alpha$ -Motoneurone.....	37
<b>2.9. Analysemethodik .....</b>	<b>38</b>
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Überleben .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2. Klinisch funktionelle und kognitive Tests.....</b>	<b>40</b>
3.2.1. Klinischer Score.....	40
3.2.1.1. Krankheitsbeginn .....	40
3.2.1.2. Beginn der schweren Krankheit.....	42
<b>3.3. Drehwalzentest Rotarod.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4. Ganganalyse Test „Catwalk“ .....</b>	<b>47</b>
3.4.1. Mittlere Dauer eines Versuchsdurchlaufs „run duration“ .....	47
3.4.2. Schrittlänge „stride length“ .....	49
3.4.3. Fläche des Pfotenabdrucks „print area“ .....	50
3.4.4. Schrittgeschwindigkeit „swing speed“ .....	52
<b>3.5. Körpergewicht .....</b>	<b>54</b>
<b>3.6. Novel Object Recognition Test.....</b>	<b>56</b>
3.6.1. Zurückgelegte Distanz.....	57
3.6.2. Zeit ohne Bewegung.....	59
3.6.3. Diskriminations-Index (DI).....	60
<b>3.7. Histologische Untersuchung des Rückenmarks in einer Querschnittsstudie.....</b>	<b>62</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1. Ergebnisse der präsymptomatischen Behandlungsstudie mit Fasudil und Riluzol .....</b>	<b>64</b>
4.1.1. Überleben.....	64
4.1.2. Klinischer Score.....	67
4.1.3. Gewicht .....	68
4.1.4. Motorische Leistungsfähigkeit im Drehwalzentest .....	69
4.1.5. Motorische Leistungsfähigkeit im Ganganalysetest.....	71
4.1.6. Kognitive Leistungsfähigkeit.....	72
<b>4.2. Ergebnisse der histologischen Analyse des Rückenmarks in einer Querschnittsstudie .....</b>	<b>74</b>
<b>4.3. Fazit und Ausblick.....</b>	<b>76</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>78</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>80</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis

ALS	-	Amyotrophe Lateralsklerose
BP	-	Basenpaare
BSA	-	<i>bovine serum albumin</i>
CI	-	Konfidenzintervall ( <i>confidence interval</i> )
ChAT	-	Cholin-Acetyl-Transferase
fALS	-	familiäre Amyotrophe Lateralsklerose
Fas30	-	Behandlungsgruppe mit Fasudil 30 mg/kg
FasRil30	-	Kombinationsbehandlungsgruppe mit Fasudil/Riluzol 30 mg/kg
FTD	-	Frontotemporale Demenz
FUS	-	<i>fused in sarcoma</i>
H <sub>2</sub> O	-	Kontrollgruppe
IL	-	Interleukin
IPC	-	<i>insoluble protein complexes</i>
MLC	-	<i>myosin light chain</i>
PBS	-	<i>phosphate-buffered solution</i>
PFA	-	Paraformaldehyd
PCR	-	Polymerasekettenreaktion
PTEN	-	<i>phosphatase and tensin homologue</i>
Ril30	-	Behandlungsgruppe mit Riluzol 30 mg/kg Körpergewicht
ROCK	-	Rho-Kinase
sALS	-	sporadische Amyotrophe Lateralsklerose
SE	-	<i>standard error</i> (Standardabweichung)
SEM	-	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SMA	-	Spinale Muskelatrophie
SOD 1	-	(Kupfer-Zink-) Superoxid-Dismutase-1
TDP 43	-	<i>TAR-DNA-binding protein-43</i>
WT	-	Wildtyp
ZTE	-	Zentrale Tiereinheit

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Spektrum von ALS und FTD.....	5
Abbildung 2: Übersicht über die derzeit bekannten genetischen Ursachen von ALS .....	6
Abbildung 3: Pathomechanismen von ALS mit entsprechenden Genveränderungen .....	7
Abbildung 4: Quantifizierung des SOD-Genprodukts mittels Gelelektrophorese.....	24
Abbildung 5: Catwalk XT .....	29
Abbildung 6: Ablauf der vier Phasen des NOR-Tests .....	32
Abbildung 7: Versuchsaufbau NOR-Test mit eingezeichneten Analysezonen .....	33
Abbildung 8: Übersichtsdarstellung eines lumbalen Vorderhorns nach ChAT-Färbung .....	37
Abbildung 9: Kaplan – Meier – Diagramm für das Überleben der Behandlungsgruppen.....	40
Abbildung 10: Darstellung des mittleren klinischen Krankheitsbeginns.....	41
Abbildung 11: Kaplan – Meier – Diagramm zur Darstellung des klinischen Krankheitsbeginns.	42
Abbildung 12: Darstellung des mittleren Beginns der schweren Krankheit.....	43
Abbildung 13: Darstellung des kumulativen Anteils der nicht schwerkranken Tiere je Versuchsgruppe im zeitlichen Verlauf des Experiments .....	44
Abbildung 14: Mittlere Zeit auf dem Rotarod pro Versuchsgruppe und Testtag .....	47
Abbildung 15: Mittlere Laufdauer der Mäuse nach Behandlungsgruppen an den Testtagen.....	48
Abbildung 16: Mittlere Schrittlänge der Vorderpfoten pro Gruppe und Versuchstag.....	50
Abbildung 17: Mittlere Fläche der Hinterfuß-Pfotenabdrücke pro Gruppe und Versuchstag.....	52
Abbildung 18: Mittlere Schrittgeschwindigkeit pro Gruppe und Versuchstag.....	53
Abbildung 19: Darstellung des Körpergewichts (g) der Versuchstiere über die Testtage.....	55
Abbildung 20: Zurückgelegte Distanz (m), differenziert nach Testgruppe und Testtag .....	58
Abbildung 21: Mittelwerte der Zeit ohne Bewegung (s) der Testgruppen an vier Testtagen.....	59
Abbildung 22: Mittelwerte des DI pro Versuchstag und Versuchsgruppe .....	61
Abbildung 23: Durchschnittliche Anzahl der $\alpha$ -Motoneurone im Vorderhorn des Rückenmarks	63
Abbildung 24: Kaplan – Meier – Diagramm über das Überleben der Behandlungsgruppen mit zensiertem Outlier in der Kontrollgruppe .....	66

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Standardmaterialien.....	19
Tabelle 2: Übersicht über die vier Behandlungsgruppen .....	21
Tabelle 3: Mittelwerte der Zeit auf dem Rotarod (s) der Versuchsgruppen an den entsprechenden Versuchstagen .....	45
Tabelle 4: Standardabweichungen der Gruppen für die Mittlere Laufdauer (s) pro Testtag .....	49
Tabelle 5: Mittleres Gewicht der Versuchsgruppen an den entsprechenden Versuchstagen.....	56
Tabelle 6: Anzahl der fehlenden Werte pro Testtag .....	57
Tabelle 7: Gemittelte zurückgelegte Distanz (m), differenziert nach Testtag und Gruppe .....	57



# **1. Einleitung**

## **1.1. Die Krankheit Amyotrophe Lateralsklerose**

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine progressiv degenerative Krankheit des motorischen Nervensystems, bei der sowohl das erste als auch das zweite (alpha)-Motoneuron im ZNS betroffen sind. Nach ihrem Erstbeschreiber, dem französischen Neurologen und Mitbegründer der modernen Neurologie Jean-Martin Charcot, wird sie auch Charcot-Krankheit genannt. Der Begriff Motoneuronerkrankung oder *motor neuron disease* schließt darüber hinaus auch jene Unterformen der ALS mit ein, die sich durch isolierte Degeneration des ersten (Primäre Lateralsklerose) oder zweiten (Spinale Muskelatrophie) Motoneurons manifestieren (Wijesekera und Leigh 2009).

## **1.2. Epidemiologie**

ALS ist mit einer Inzidenz von 2/100.000 und einem mittleren Diagnosealter bei Männern von 65,2 Jahren und bei Frauen von 67,0 Jahren eine seltene Krankheit des älteren Menschen. Männer erkranken mit 3/100.000 etwas häufiger als Frauen (2/100.000), weil die spinal beginnende ALS bei Männern häufiger auftritt als bei Frauen. Geographische Unterschiede in der Inzidenz finden sich nicht. Die Schwere der Krankheit und die daraus resultierende geringe mittlere Lebenserwartung von 2-4 Jahren führen insgesamt zu einer niedrigen Prävalenz (Logroscino et al. 2010; Uenal et al. 2014; Calvo et al. 2017).

## **1.3. Klinisches Bild und Symptomatik**

Die klassische Form der ALS, welche bei ungefähr zwei Drittel aller Patienten vorliegt, manifestiert sich durch einen kontinuierlichen, irreversiblen Untergang beider Motoneurone und führt daher bei den betroffenen Patienten, bedingt durch die Denervation, zu einer Muskelatrophie (und einem damit verbundenen Gewichtsverlust). Diese bedingt einen Kraftverlust, welcher meist in den distalen Extremitäten beginnt und sich zu einer kompletten Parese aller Muskelgruppen entwickelt. Die Augenmuskulatur bleibt klassischerweise bis zuletzt erhalten, wohingegen die Atemmuskulatur auch schon im frühen Krankheitsstadium (z. B. bei axialen Verlaufsformen) betroffen sein kann. Die Patienten versterben schließlich meistens an

einer Aspirationspneumonie, die durch die zunehmenden Schluck- und Atemstörungen mit konsekutiv erhöhtem Infektionsrisiko bedingt ist (Wijesekera und Leigh 2009).

In der klinisch-neurologischen Untersuchung können Faszikulationen, Crampi, eine Affektlabilität wie z. B. pathologisches Weinen oder bulbäre Symptome wie Sprech- und Schluckstörungen einen Hinweis auf eine ALS liefern. Treten letztgenannte Symptome bereits sehr früh im Krankheitsverlauf auf, kann dies auch ein Hinweis auf die bulbäre Form der ALS sein, welche außerdem durch Sialorrhoe und eine Schwäche des unteren Teils der Gesichtsmuskulatur gekennzeichnet ist. Diese Klassifikation ist keine rein akademische Einteilung, sondern dient auch dem klinischen Informationsgewinn, weil die bulbäre Form der ALS mit einer deutlich schlechteren Prognose einhergeht (Ganesalingam et al. 2009; Talman et al. 2016).

#### **1.4. Diagnosestellung**

Die Problematik der Diagnosestellung erkennt man daran, dass bei ALS-Patienten von Symptombeginn bis zur Diagnosestellung im Durchschnitt mehr als ein Jahr vergeht, wobei die große Standardabweichung in einer Studie von Logroschino et al. 2010 ( $370.9 \text{ Tage} \pm 372.4$ ) einen Hinweis auf die Unterschiede hinsichtlich der Versorgung und Kenntnisse der behandelnden Ärzte über die Erkrankung liefern kann. Dies zeigt sich um so mehr bei anderen Formen von Motoneuronerkrankungen wie der isolierten Lähmung einer Extremität (*flail limb syndrome*) oder der primären Lateralsklerose, bei denen die Diagnosestellung im Mittel ca. 18 Monate nach dem ersten Auftreten der Symptomatik erfolgt (Talman et al. 2016).

Sie erfolgt anhand der *Airie-House*-Kriterien, welche aus einer Aktualisierung der *El-Escorial*-Kriterien von 1994 im Jahr 2009 hervorgingen (Brooks 1994; Brooks et al. 2009). Die Kriterien setzen für die Diagnose einer „definitiven ALS“ eine Affektion des 1. und des 2. Motoneurons mit progressiver Ausbreitung der Symptome in drei von vier Körperregionen (bulbär, zervikal, thorakal, lumbosakral) voraus. Gleichzeitig darf es keine andere elektrophysiologische oder neuroradiologische Erklärung für diese Symptome geben. Je weniger Körperregionen betroffen sind, desto unsicherer wird die Diagnosestellung, wobei Denervierungszeichen in der Elektromyografie (EMG) und typische klinische Symptome wie Dysarthrie oder Kraftverlust den behandelnden Ärzten wichtige Hinweise liefern können. Spezifische Untersuchungen wie Liquor- oder Blutmarker zur Diagnose der ALS sind bisher trotz umfangreichster

Forschungsbemühungen nicht bekannt. Die ALS, auch wegen der mit ihr verbundenen weitreichenden medizinischen und psychosozialen Folgen, bleibt damit bis heute eine Ausschlussdiagnose.

## **1.5. Ätiologie und Pathogenese**

Klassisch werden zwei Formen der ALS unterschieden: die sporadische oder auch idiopathische Form (sALS), deren Ursache nach wie vor unbekannt ist, und die familiäre ALS (fALS), bei der die Krankheit durch genetische Veränderungen entsteht. Diese sind meist hereditär bedingt, können aber auch wie bei vielen anderen Erkrankungen durch Neumutationen verursacht werden. Die fALS liegt bei 10% aller ALS Fälle vor (Wijesekera und Leigh 2009; Lattante et al. 2015). Neben genetischen Ursachen wurden auch Umweltfaktoren beschrieben, welche das Risiko, an ALS zu erkranken, erhöhen. In den letzten Jahren zeigt sich jedoch zunehmend, dass der Begriff „ALS“ oder „Motoneuron-Erkrankung“ zu kurz greift, da auf Grund des sehr heterogenen Krankheitsbildes eine Subklassifizierung nötig ist (Turner et al. 2013). Dies ist Teil des derzeitigen wissenschaftlichen Diskurses.

## **1.6. Familiäre ALS-Formen**

### **1.6.1. SOD1 als genetische Grundlage der ALS**

1993 wurde von Rosen et al. eine dominante Mutation des Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase-1-Gens (*SOD1*) beschrieben, welche für ca. 12% der fALS-Fälle verantwortlich ist. Bis heute sind über 100 verschiedene Mutationen mit unterschiedlichen Schweregraden der hervorgerufenen Erkrankung beschrieben (Andersen 2006).

Der *SOD1*-Genlocus codiert die Superoxid-Dismutase-1, ein Enzym, welches im gesunden Zustand freie Radikale in Körperzellen abbaut und somit den oxidativen Stress in Zellen senkt (Rosen et al. 1993; Wijesekera und Leigh 2009; Lattante et al. 2015). Die freien Radikale oder auch „Superoxide“ entstehen physiologisch als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskette. Im mutierten Zustand ist die Aktivität der SOD1 auf weniger als die Hälfte reduziert. So wurde zunächst angenommen, dass diese Dysfunktion zu einer Akkumulation von toxischen, freien Radikalen führt, die konsekutiv betroffene Motoneurone schädigen (Deng et al. 1993; Orrell et al. 1995). Ausgehend von dieser Idee und dem damaligen Verständnis der

Pathogenese führte diese Entdeckung zu der Annahme, dass eine Therapie mit Antioxidantien den oxidativen Stress und damit die Erkrankung effektiv bekämpfen könne (vgl. Unterpunkt 1.8.). Diese These wurde in den folgenden Jahren allerdings dadurch widerlegt, dass es in verschiedenen SOD1-Mausmodellen trotz einer gleichbleibenden (Borchelt et al. 1994), einer deutlich erhöhten (Wong et al. 1995) oder einer gänzlich fehlenden SOD1-Enzymaktivität (Reaume et al. 1996) zum Ausbruch der Erkrankung kommt und die SOD1-Aktivität daher nicht mit dem Krankheitsbeginn oder der Krankheitsschwere korreliert (Bowling et al. 1995; Cleveland et al. 1995; Cleveland und Rothstein 2001).

Als weiterer möglicher Pathomechanismus als Folge einer SOD1-Mutation wird die Aggregation von Proteinen verdächtigt, die auch bei vielen anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie z. B. M. Parkinson oder der Demenz vom Alzheimer Typ nachgewiesen werden konnte (Forman et al. 2004). Diese Vermutung beruht auf der Tatsache, dass fehlgefaltete SOD1-Proteine sich im Krankheitsverlauf im Sinne eines *gain of function* zunehmend an die äußere mitochondriale Membran sowie im Intermembranspalt anlagern und somit die dort ablaufenden Prozesse stören könnten (Pickles und Vande Velde 2012; Tafuri et al. 2015). Der selektive Untergang der Motoneurone lässt in diesem Kontext annehmen, dass die Proteinablagerungen nicht zu einer generellen Schädigung der mitochondrialen Atmungskette führen, sondern die Zellen durch einen anderen Mechanismus spezifisch schädigen. Dieser Mechanismus könnte z. B. eine Veränderung von Kalziumtransportern und Regulationsproteinen sein, welche eine selektive Schädigungsanfälligkeit von Rückenmarksneuronen gegenüber Kalziumschwankungen erklärt (Fuchs et al. 2013). Auch konnte gezeigt werden, dass SOD1-Aggregate in Motoneuronen und Astrozyten bereits vor Beginn der klinischen Symptomatik auftreten und durch Zusammenlagerung *insoluble protein complexes* (IPCs) bilden, die den axonalen Transport in Neuronen behindern, welcher essentiell für das Zellüberleben ist (Bruijn et al. 1998; Dupuis et al. 2000; Julien 2001). Weiterhin führen die Aggregate zu Mikrogliaaktivierung und zur Blockade des Ubiquitin-Apoptose-Mechanismus, und damit konsekutiv zur Schädigung von Neuronen (Bruijn et al. 2004; Forman et al. 2004).

Neben den bereits erwähnten Mechanismen werden außerdem die Aktivierung von Caspasen und Veränderungen in Bcl-2 als mögliche Pathomechanismen diskutiert (Forman et al. 2004). Der genaue Mechanismus der Zellschädigung durch die *SOD1*-Mutation ist jedoch nach wie vor unklar und Gegenstand intensiver Forschung.

### 1.6.2. Genveränderungen im Spektrum von ALS und frontotemporaler Demenz (FTD)

Schon 2005 wurde gezeigt, dass sich cytoplasmatische Ubiquitin-Einschlüsse bei Patienten mit Motoneuronenerkrankung sowie bei Patienten mit kombinierten Formen von ALS/FTD finden, und daher postuliert, dass diese ein Spektrum derselben klinischen Erkrankung darstellen (Mackenzie und Feldman 2005). Eine genetische Grundlage für dieses Erkrankungsspektrum wurde daher immer wahrscheinlicher. Seit der Entdeckung der *SOD1*-Mutation 1993 wurden im Laufe der Jahre weitere Genloci entdeckt, die fALS bedingen. Weil viele der Mutationen mit einer geringen Penetranz und/oder mit einer geringen Erkrankungsrisikoerhöhung assoziiert sind, werden inzwischen Haupt- und Nebengene unterschieden. Zu den Hauptgenen zählt unter anderem *TARDBP*, welches für ca. 4% der fALS-Fälle verantwortlich ist und TDP-43 codiert. Dieses Protein wurde gleichermaßen in Aggregaten bei der ALS und der frontotemporalen Demenz (FTD) nachgewiesen (Neumann et al. 2006; Kabashi et al. 2008). Über die genaue Funktion von TDP-43 ist bisher wenig bekannt; es spielt eine Rolle in der RNA-Prozessierung und im RNA-Transport zwischen Nucleus und Cytosol (Therrien et al. 2016).

Ein weiteres Hauptgen ist *FUS*, das ebenfalls für ca. 4% der fALS Fälle verantwortlich ist und ebenfalls die RNA-Prozessierung beeinflusst, wobei es an späterer Stelle die gleiche Signalkaskade beeinflusst wie TDP-43 (Kabashi et al. 2011). Es wird daher angenommen, dass RNA-Dysfunktion eine wichtige Rolle in der Pathogenese von fALS spielt (Ling et al. 2013).

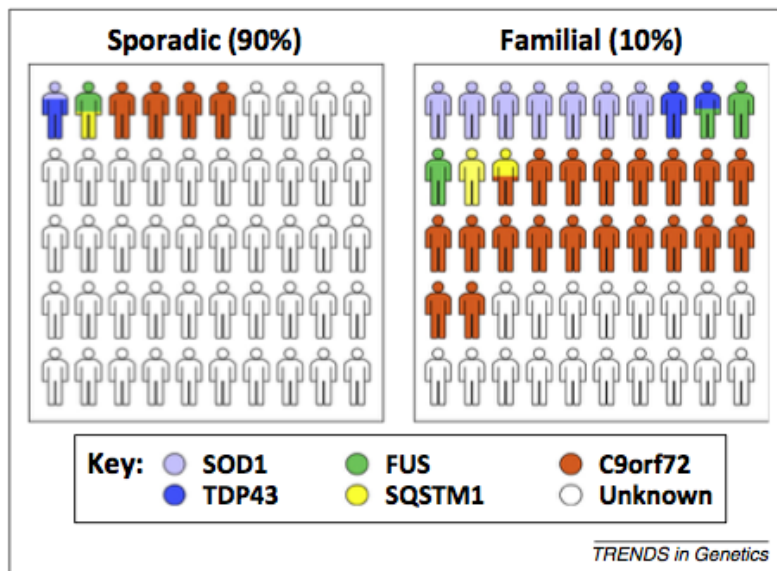
Disorder	ALS	ALS/FTD	FTD
<b>Clinical features</b>	Muscle atrophy Dysphagia Dysarthria Spasticity Hyperreflexia Babinski's sign Fasciculation Respiratory failure		Disinhibition Apathy Change in personality Unusual verbal, physical, or sexual behavior Loss of semantic understanding Apraxia Hallucinations
<b>Pathology</b>	Ubiquitin inclusions TDP-43 inclusions FUS inclusions	Ubiquitin inclusions TDP-43 inclusions FUS inclusions	FTD-Tau FTD-TDP FTD-FUS
<b>Genes mutated</b>	<i>C9orf72</i> <i>SOD1</i> <i>TARDBP</i> <i>FUS</i> <i>OPTN</i> <i>PFN1</i> <i>MATR3</i> <i>TUBA4A</i> <i>TBK1</i>	<i>C9orf72</i> <i>TARDBP</i> <i>FUS</i> <i>VCP</i> <i>SQSTM1</i> <i>UBQLN2</i> <i>CHCHD10</i>	<i>PGRN</i> <i>C9orf72</i> <i>MAPT</i> <i>CHMP2B</i>

<sup>a</sup>Although the clinical signs of ALS and FTD are discordant, there is an overlap in the pathological and genetic markers in these diseases. Furthermore, patients who represent shared clinical as well as either genetic or pathological markers of disease are currently recognized as having ALS/FTD.

#### Abbildung 1: Das Spektrum von ALS und FTD

Die Tabelle stellt die genetischen Mutationen, pathologischen Auffälligkeiten und klinischen Manifestationen im ALS/FTD-Spektrum dar. Abbildung entnommen aus Lattante et al. 2015 mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags.

Nachdem Talbot 2010 bereits das baldige Ende der genetischen Entdeckungen als Ursache der ALS postuliert hatte, konnte mit der Entdeckung von nichtcodierenden, sich wiederholenden Sequenzen, sogenannten *hexanukleotid repeats* im *C9orf72*-Gen die These einer genetischen Verbindung zwischen ALS und FTD erneut untermauert werden. Diese Veränderung ist nach derzeitigem Kenntnisstand gleichermaßen für ca. 23% der fALS-Fälle und ca. 12% der familiären FTD-Fälle verantwortlich (DeJesus-Hernandez et al. 2011). Auch hier ist der genaue Pathomechanismus noch unbekannt; eine Verbindung zur RNA-Prozessierung wird auch bei diesem Gen vermutet (Renton et al. 2013).



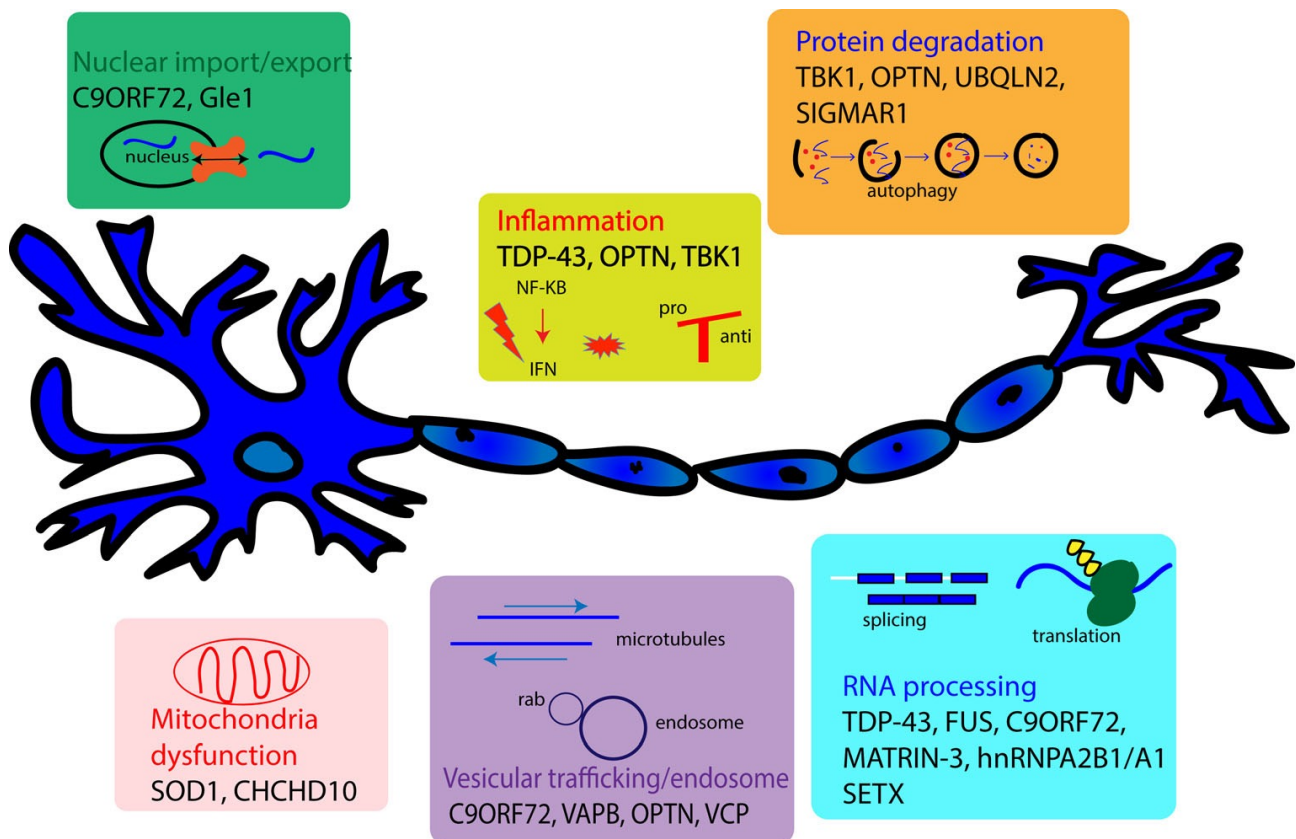
**Abbildung 2: Übersicht über die derzeit bekannten genetischen Ursachen von ALS**

Auf der linken Seite der Abbildung sind die sporadischen ALS-Fälle und die Häufigkeit von gefundenen Mutationen abgebildet. Auf der rechten Seite finden sich die familiären ALS-Fälle und entsprechende Mutationen. Die SOD1 Mutation findet sich nach C9orf72 am häufigsten. Entnommen aus Lattante et al. 2015 mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags.

In diesem Spektrum der Krankheiten verursacht die *SOD1*-Mutation jedoch nach bisherigen Erkenntnissen eine ALS-Form, die keine TDP-43-Aggregate zeigt und auch nicht die mit *TARDBP* oder *FUS* assoziierten phänotypischen Veränderungen aufweist. Es wird daher davon ausgegangen, dass der *SOD1*-assoziierten fALS ein anderer, losgelöster Mechanismus zu Grunde liegt (Mackenzie et al. 2007; Kabashi et al. 2011; Lattante et al. 2015). Wicks et al. (2009) zeigten, dass kognitive Defizite bei Patienten mit *SOD1* assoziierter fALS seltener vorkommen als in nicht *SOD1*-assoziiertes fALS. Außerdem konnte in einer klinischen Genotyp-Phänotyp-Korrelationsstudie von zehn Patienten mit *SOD1*-Mutation kein Patient die Diagnosekriterien

einer FTD erfüllen. Im Vergleich erfüllten zwei von zehn Patienten mit *TARDBP*-Mutation die Kriterien für eine FTD (Millecamps et al. 2010). Bisher finden sich in der Literatur jedoch keine Studien, die in Tiermodellen gezielt nach kognitiven Defiziten bei einer *SOD1*-G93A-Mutation suchen oder diese berichten.

Es gibt noch mehrere weitere Gene, welche bisher in Zusammenhang mit fALS gebracht werden konnten wie z. B. *SQSTM1*, *PFN1*, *UBQLN2* oder *VCP* (Renton et al. 2013). Nach dem derzeitigen Wissensstand gibt es somit zahlreiche genetische Ursachen, die durch unterschiedliche Mechanismen zu fALS führen und größtenteils gleichzeitig eine FTD hervorrufen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die raschen Fortschritte in der Hochdurchsatzsequenzierungstechnologie die Entdeckung weiterer Gene in den nächsten Jahren ermöglichen werden. Auch die Rolle von epigenetischen Faktoren mit Einfluss auf Genexpression und -regulierung wurde für ALS bisher kaum adressiert und birgt viel Potenzial, das Krankheitskonzept „ALS“ zu verstehen (Al-Chalabi et al. 2013).



**Abbildung 3: Pathomechanismen von ALS mit entsprechenden Genveränderungen**  
 Entnommen aus Therrien et al. (2016) mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags.

## **1.7. Andere Risiko- und Protektionsfaktoren für ALS**

Neben familiärer Disposition gibt es weitere Risikofaktoren für ALS wie z. B. die mit professionellem Fußballspielen oder aktivem Militärdienst verbundenen Kopftraumata oder die Exposition gegenüber bestimmten Pestiziden (Chlorkohlenwasserstoffe, polychlorierte Biphenylene und polybromierte Biphenylene) (Chio 2005; Su et al. 2016). Eine dänische populationsbasierte Studie lieferte dagegen zum Beispiel den Hinweis darauf, dass Diabetes Typ 2 einen protektiven Faktor gegenüber ALS darstellt (Kioumourtzoglou et al. 2015).

Die ALS scheint daher - ähnlich wie Morbus Parkinson - der klinische Phänotyp einer sehr heterogenen Gruppe von genetischen Ursachen sowie Umweltfaktoren zu sein, welche alle letztendlich zu einem ähnlichen Schädigungsmuster und Krankheitsbild führen.

## **1.8. Behandlungsstrategien von Amyotropher Lateralsklerose**

Derzeit gibt es keine Möglichkeit, ALS zu heilen. Seit 1996 ist zusätzlich zu der umfangreichen symptomatischen Therapie durch Physio-, Ergo-, Logo- und Psychotherapeuten das Medikament Riluzol in der Dosierung 100 mg/d zur oralen Applikation zugelassen (Wokke 1996). 2017 wurde mit Edaravone, welches über eine anti-oxidative Wirkung verfügt, in den USA das zweite Medikament zugelassen (Abe et al. 2014).

### **1.8.1. Riluzol in der Behandlung von ALS**

Am Menschen wurde 1994 gezeigt, dass die Behandlung mit dem antiglutamaterg wirkenden Riluzol (6-(Trifluormethoxy)-1,3-benzothiazol-2-amin) bei der bulbären Form der ALS das Überleben signifikant verlängert und den Schwund der Muskelkraft verzögert (Bensimon et al. 1994). Eine auf diesen Ergebnissen aufbauende Studie zur Findung der optimalen Dosierung zeigte bei 100 mg/kg Körpergewicht das beste Nutzen-Nachteil-Verhältnis und konnte weiterhin den zwar geringen, aber signifikanten Überlebensvorteil der Behandlung auch bei der spinalen Form der ALS bestätigen (Lacomblez et al. 1996). Diese Dosierung wurde in der Folge für die Markteinführung gewählt. Damit war Riluzol das erste und einzige Medikament, welches speziell bei ALS eingesetzt wurde.



Seit der Einführung des Medikaments werden diese geringen positiven Effekte, welche unter anderem hohen Medikamentenkosten gegenüberstehen, kontrovers diskutiert. 2003 zeigte jedoch eine Metaanalyse von Miller et al. (2003) wiederholt einen geringen positiven Effekt.

Metaanalysen der Cochrane Cooperation bestätigten dies wiederholt und zeigten zuletzt 2012, dass neben den zwei bereits erwähnten Studien zwei weitere Arbeiten die Wirksamkeit von Riluzol belegen (Bensimon et al. 2002). Die Autoren empfahlen weiterhin eine Behandlung von ALS-Patienten mit Riluzol (Miller et al. 2012). Auch die aktuelle deutsche S1 Leitlinie zur Behandlung von ALS spricht sich für eine Behandlung aus (DGN 2014). Auch in einer Kohortenstudie mit über 1400 ALS-Patienten konnte bei den mit Riluzol behandelten Patienten eine leicht verbesserte motorische Leistungsfähigkeit nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich bei den Patienten mit einer Behandlung von 100mg Riluzol Tagesdosis eine geringere Sterblichkeit, welche bei Patienten mit einer geringeren Dosis oder ohne Behandlung nicht auftrat (Chen et al. 2016). In diesem Kontext ist es jedoch erwähnenswert, dass auf Grund der späten Diagnosestellung eine Behandlung mit Riluzol im Mittel erst zehn bis zwölf Monate nach Symptombeginn begonnen werden kann, sodass Patienten bei einer mittleren Überlebenszeit von 44 Monaten während ca. 25% ihrer Erkrankungsdauer keine Behandlung erhalten (Talman et al. 2016; Calvo et al. 2017). Dieser Fakt veranlasste Knibb et al. (2016) zur Entwicklung eines Tools zur einfachen Abschätzung der Effekte von Riluzol und weiteren verschiedenen Behandlungsmethoden wie z. B. die nicht invasive Beatmung, welche das Überleben ebenfalls verlängert. Das Tool besteht aus vier Graphen, welche es Ärzten erleichtern sollen, ihre Patienten hinsichtlich der Therapieoptionen zu beraten. Eine weitere Studie konnte in verschiedenen Subgruppen einen unterschiedlichen Behandlungserfolg mit Riluzol feststellen. Ältere Patienten sowie Patienten mit einem bulbären Krankheitsbeginn zeigten eine größere Verbesserung der Überlebensrate als Patienten mit einem Krankheitsbeginn in den Extremitäten (Zoccolella et al. 2007).

### 1.8.2. Experimentelle Behandlungsansätze

Sehr viele verschiedene Substanzen und Medikamente wurden bereits in präklinischen Modellen auf ihren günstigen Effekt auf die ALS-Pathologie getestet, konnten jedoch in klinischen Studien keinen Nachweis einer Lebenszeitverlängerung erbringen (Cleveland und Rothstein 2001). Basierend auf der Theorie des durch die SOD1-Mutation erhöhten oxidativen Stresses in Zellen,

hatte die Gabe von Vitamin E zu einem der erfolgversprechendsten Ansätze gehört, da die die Hoffnung bestand, dass ALS durch die antioxidative Wirkung günstig zu beeinflussen sei. Leider konnte für eine Hochdosistherapie kein signifikant positiver Effekt gezeigt werden (Graf et al. 2004). Im Gegensatz dazu konnte für Edaravone, welches ebenfalls antioxidativ wirkt, ein positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf nachgewiesen werden (Abe et al. 2014)

Auch für die neuroprotektive Substanz Xaliproden konnte in einer klinischen Phase-III-Studie über einen Trend hinaus keine signifikanten Einflüsse auf die Krankheitsprogression von ALS nachgewiesen werden (Meininger et al. 2009).

Neue Hoffnung auf ein krankheitsmodifizierendes Medikament resultierte aus den Ergebnissen einer Phase-IIa-Studie mit Bromocriptin, welche ihren Focus auf funktionelle Parameter wie Kommunikation und Nahrungsaufnahme legte (Nagata et al. 2016). Leider wurden auch diese Hoffnungen durch die negativen Ergebnisse von Dexpramipexol – ebenfalls ein Dopaminagonist – nicht erfüllt, da in einer großen Studie keine Vorteile einer Behandlung gegenüber Placebo nachgewiesen werden konnten (Cudkowicz et al. 2013).

## **1.9. Experimentelle Methoden und Behandlungsansätze in Tiermodellen der ALS**

### 1.9.1. Das SOD-G93A-Mausmodell

Nach der Entdeckung der *SOD1*-Mutation konnte innerhalb kurzer Zeit das entsprechende SOD-G93A-Mausmodell entwickelt werden, welches die fALS im Tiermodell simuliert (Gurney 1994). Dieses Modell wurde seitdem in zahlreichen Experimenten sowie den Vorstudien und Publikationen zu diesem Experiment verwendet (Tönges et al. 2013; Günther 2015; Günther et al. 2017) und gilt nach wie vor als das am häufigsten verwendete Mausmodell zur Simulation der fALS für Forschungszwecke. Die Grundlage bildet die Mikroinjektion von transgener DNS in befruchtete Mauseizellen, die danach in ein scheintragendes Weibchen vom Stamm C57BL/6J implantiert werden. Die hemizygoten Nachkommen werden danach mit einer SJL/J-Mauslinie verpaart, um einen transgenen Mausstamm zu gründen. Der daraus resultierende B6SJL-Mausstamm wird von Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) gezüchtet und wird auch im vorliegenden Experiment als Grundlage verwendet.

Die SOD1-G93A-Mutation wird autosomal dominant von der Elterngeneration an die F1-Generation weitervererbt, sodass bei vollständiger Penetranz im Durchschnitt 50% der Nachkommen an fALS erkranken.

### 1.9.2. Klinisches Erscheinungsbild und Überleben

Die klinische Symptomatik der transgenen Tiere beginnt durchschnittlich an Lebenstag  $91 \pm 14$  Tage mit einem Tremor der Hinterläufe und zeigt sich im weiteren Verlauf durch eine progrediente Muskelatrophie sowie durch spastische Paralysen der Extremitäten (Chiu et al. 1995). Konsistent dazu erkrankten die unbehandelten weiblichen Tiere in den Vorstudien unserer Arbeitsgruppe im Mittel an Tag  $88,75 \pm 3,14$  (Günther 2015). Die Muskelatrophien treten während des Krankheitsverlaufes zunächst an den Hinterläufen auf, was zu einem „Watschelgang“ führt, bei dem die Tiere beim Laufen mit dem Rücken hin und her wackeln. Im weiteren Verlauf ist es den Tieren nicht mehr möglich, ihr Becken vom Untergrund zu heben, sodass sie sich zur Fortbewegung mit den Vorderfüßen nach vorne ziehen müssen. Betrifft die Parese schließlich auch die Vorderbeine, wird eine Fortbewegung zunehmend schwieriger und die Tiere sind nicht mehr in der Lage, das Futter zu erreichen oder sich selbstständig aus der Rücken- bzw. Seitenlage in die Bauchlage zu drehen, was den Endpunkt des Experimentes darstellt. Der beschriebene Krankheitsverlauf umfasst insgesamt ca. 4 Monate (Chiu et al. 1995; Günther 2015), wobei die exakte Lebenserwartung der Tiere je nach Studie zwischen  $123 \pm 3,4$  Tagen (Miana Mena et al. 2009) und  $143,7 \pm 2,3$  (Klivenyi et al. 1999) variiert. In den Vorstudien unserer Arbeitsgruppe zeigte sich mit  $141,2 \pm 2,5$  Tagen eine ähnliche Lebenserwartung (Günther 2015).

Verschiedene klinische Parameter und Versuchsmethoden sind in der Literatur beschrieben worden, um den Verlauf der Erkrankung zu quantifizieren und möglichst früh einen Unterschied zwischen Wildtypen und transgenen Tieren festzustellen.

Das Körpergewicht der Versuchstiere wird als objektiver und sensibler klinischer Parameter des Gesundheitszustands beschrieben, welcher sowohl durch die progredienten Muskelatrophien als auch durch eine mögliche Verringerung der Nahrungsaufnahme in schweren Krankheitsstadien beeinflusst wird. Beeinflusst werden kann er jedoch auch durch viele gewöhnliche Faktoren wie z. B. Dehydration, welche nicht in Zusammenhang mit ALS stehen (Weydt et al. 2003). In einer Studie von Smittkamp et al. (2008) zeigte sich an Lebenstag 108 zum ersten Mal eine Differenz der Mittelwerte der Gruppe der Wildtypen von der Gruppe der transgenen Tiere, welcher vor allem durch eine Stagnation der Gewichtszunahme der erkrankten Tiere in Kombination mit einer weiteren Gewichtszunahme der Wildtypen verursacht wurde. Miana Mena et al. (2009)

beschrieben eine Gewichtsdivergenz der Gruppen bereits ab der zweiten Lebenswoche, was die Spannweite der in der Literatur beschriebenen Unterschiede verdeutlicht.

Zum Nachweis des Verlusts der motorischen Leistungsfähigkeit sowie der progredienten Lähmungen ist der Drehwalzentest (Rotarod-Test) eine etablierte Methode, welche je nach Studiendesign früher oder später einen Unterschied zwischen Wildtypen und transgenen Tieren zeigen konnte. Zwei Studien zeigten diesen bei einem konstanten Setting aus 15 Rotationen pro Minute (*rotations per minute* (rpm)) und einem Mittelwert aus 3 Läufen pro Untersuchung ab Lebensstag 98 (Weydt et al. 2003; Miana Mena et al. 2009). Es finden sich in der Literatur auch andere Versuchsdesigns mit Beschleunigung, wie z. B. drei Läufe, beginnend mit 1 rpm mit einer Beschleunigung von 1 rpm alle zehn Sekunden bis zum Herunterfallen der Maus (Klivenyi et al. 1999) oder einer Beschleunigung von 4 auf 40 rpm in 300 Sekunden (Mead et al. 2011).

Ein relativ neues Verfahren zur Bestimmung motorischer Defizite von Mäusen und Ratten stellt die automatische Analyse des Gangbildes dar, deren Signifikanz bezüglich der Detektion von frühen klinisch funktionellen Auffälligkeiten im SOD-G93A-Mausmodell derzeit diskutiert wird, da die Ergebnisse in der Literatur variieren. Zuerst wurden früh messbare Unterschiede der motorischen Leistungsfähigkeit mit Hilfe dieser Methoden von Mitarbeitern des Jackson-Konzerns, welcher den SOD1-G93A-Mausstamm züchtet und vertreibt, berichtet (Wooley et al. 2005). Im Gegensatz dazu konnte eine andere Studie überhaupt keine motorischen Defizite feststellen (Guillot et al. 2008).

Im Vergleich zum Drehwalzentest war der Ganganalyse-Test mit dem Noldus Catwalk XT<sup>TM</sup> (Noldus Information Technology, Wageningen, Niederlande) als Analysegerät in einer neueren Studie erst spät in der Lage, Gruppenunterschiede zwischen WT und transgenen Tieren zu zeigen. Es wurden jedoch auch frühe Veränderungen berichtet, welche sich im Verlauf des Versuches erstaunlicher Weise wieder zurückbildeten (Mead et al. 2011). In einer weiteren Studie mit dem gleichen Analysegerät wurden signifikante Abweichungen der transgenen Tiere bezüglich der Parameter Schrittlänge *step length* und Dauer eines Laufes *run duration* ab Lebenswoche 17 (Lebensstag 119) gefunden (Knippenberg et al. 2010). Kritisch betrachtet erscheinen die Ergebnisse beider letztgenannter Studien auf Grund der geringen Gruppengröße von (n=5 bzw. n=4), einer hohen Standardabweichung und einer statistischen Analyse mittels separaten ANOVAs ohne die Einbeziehung einer Messwiederholung fragwürdig und sollen auf ihre Reproduzierbarkeit in diesem Experiment überprüft werden.

### 1.9.3. Kognitive Leistungsfähigkeit

Verglichen mit klinischen und motorischen Parametern ist die kognitive Leistungsfähigkeit der Versuchstiere im SOD-G93A-Mausmodell bisher wenig untersucht worden. In einer Studie wurden die Versuchstiere für einige Zeit in einer Box mit fünf unterschiedlichen Objekten platziert und danach wieder zurück in ihren Käfig gesetzt. Nach räumlichem Vertauschen von zwei Objekten wurden die Tiere erneut in die Box platziert, wobei die Kontakte der Tiere zu den Objekten gezählt wurden. Insgesamt explorierten die transgenen Tiere im Vergleich zu den Wildtypen die vertauschten Objekte häufiger, sodass die Autoren den transgenen Versuchstieren ein besseres räumliches Gedächtnis zuschrieben (Spalloni et al. 2006).

### 1.9.4. Der Novel Object Recognition Test (NOR-Test)

Der Novel Object Recognition Test (NOR) wurde 1988 durch Ennaceur und Delacour etabliert und wurde seitdem in zahlreichen Versuchskonfigurationen eingesetzt und modifiziert (Ennaceur und Delacour 1988; Antunes und Biala 2011). Ziel des Tests ist zu prüfen, ob ein Versuchssubjekt zwischen einem neuen und einem bekannten Objekt differenzieren kann. Dies kann auf einfache, nicht invasive Weise gezeigt werden, indem die Versuchssubjekte mehr Zeit mit der Erkundung von neuen Objekten verbringen als mit solchen, die ihnen schon bekannt sind. Allen Testmodifikationen ist dabei gemeinsam, dass zunächst auf eine Phase der Gewöhnung an die Testarena eine Phase mit zwei gleichen Objekten folgt. Als drittes gibt es eine Latenzzeit, welche das Versuchssubjekt an einem anderen Ort als der Testarena verbringt und als letztes eine Erinnerungsphase, in der sich neben einem bekannten Objekt ein neues Objekt in der Arena befindet (siehe Methodenteil).

Um die Fähigkeit der Diskrimination zwischen den Objekten zu quantifizieren, entwickelten Ennaceur und Delacour (1988) den sogenannten „Diskriminations-Index“ (DI), welcher wiederholt auch in weiterführenden Studien verwendet wurde (Silvers et al. 2007). Dieser berechnet sich nach der Formel:  $[DI = (TN - TF)/(TN + TF)]$ . Die Zeit, in der das Testsubjekt das neue Objekt exploriert, wird als TN bezeichnet und die Zeit, in der das Testsubjekt das bekannte Objekt exploriert, wird als TF bezeichnet. Der Index kann somit zwischen den Werten +1 und -1 liegen, wobei 0 keine Präferenz anzeigt und +1 das reine Explorieren des neuen Objekts. Falls jedoch das Erinnerungsvermögen der Mäuse durch Krankheit oder Genveränderungen beeinträchtigt ist, kann die Maus sich eventuell nicht mehr an das schon gezeigte Objekt erinnern,

was zu einer Angleichung der Betrachtungszeiten für beide Objekte führt. Der Test ist allerdings anfällig für andere Einflussfaktoren wie Ängstlichkeit oder motorische Leistungsfähigkeit der Tiere. Störungen der Tiere durch Geräusche oder Licht, welche eine Angstreaktion der Mäuse hervorrufen sind daher maßgebliche Einflussfaktoren und können nicht sicher aus den Analysen herausgerechnet werden.

#### 1.9.5. Immunhistochemische Analysen des Zentralnervensystems (ZNS)

Immunhistochemische Methoden sind ein etabliertes Instrument zur Darstellung von bestimmten Zelltypen in Gewebepäparaten. Die Methode basiert auf spezifischen Antikörpern, welche sich an Zielstrukturen im Gewebe binden und in einem zweiten Schritt durch einen weiteren fluoreszierenden Antikörper markiert werden.

Acetylcholin ist ein typischer Neurotransmitter präganglionärer Neurone des vegetativen Nervensystems, postganglionärer parasymphathischer Neurone und vor allem von Motoneuronen im ZNS. Die Synthese von Acetylcholin wird durch das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) und durch den Abbau durch die Acetylcholinesterase ermöglicht. Signifikante Mengen an ChAT scheinen nur in cholinergen Neuronen vorhanden zu sein und stellen damit einen geeigneten Marker für Motoneurone dar, indem diese durch ChAT-Antikörper markiert werden.

Im SOD-G93A-Mausmodell konnte der vermehrte Untergang des zweiten Motoneurons im ventralen Horn des lumbalen Rückenmarks bei transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtypen immunhistochemisch nachgewiesen werden (Gurney 1994; Chiu et al. 1995). Seither wird diese Analysemethodik auch zum Vergleich von Versuchsgruppen in Behandlungsstudien verwendet (Klivenyi et al. 1999; Yoo und Ko 2012).

#### 1.9.6. Experimentelle Behandlungsansätze

Am SOD-G93A-Mausmodell wurden bisher über 150 Behandlungsstudien mit symptomatischer und präsymptomatischer Gabe von verschiedenen Substanzen durchgeführt, welche in einer Metaanalyse zusammengefasst wurden (Benatar 2007). Der positive Einfluss aller Behandlungen auf das Überleben liegt im Mittel bei 12,2 (CI 8,7-16,8) Tagen. Interessanterweise zeigen die drei Studien mit Riluzol als Behandlung lediglich eine Differenz der Überlebenstage der Versuchstiere von 2,5 (CI -0,79-5,79) (Angelov et al. 2003), 5,9 (CI 4,05-7,75) (Waibel et al. 2004) und 3,0 (CI 0,08 – 5,92) (Gurney et al. 1996) Tagen im Vergleich zu unbehandelten

Tieren. Das größte Potenzial sehen die Autoren in Minocyclin, Cox-2-Inhibitoren und antioxidativen Substanzen wie Kreatinin.

In diesem Zusammenhang weisen die Autoren jedoch auf eine mangelnde Qualität eines Großteils der Studien hin, da die Untersucher oft nicht verblindet waren und die Versuchsgruppen nicht randomisiert wurden. Außerdem wurde auf einen großen *publication bias*, also dem vermehrten Veröffentlichen von positiven Studien gegenüber Studien mit negativem Ergebnis, hingewiesen. Ferner wird oft der inhaltliche Fehler begangen, statistische Signifikanzen mit klinischer Relevanz zu verwechseln (Benatar 2007).

## **1.10. ROCK-Inhibition durch Fasudil in der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen**

### 1.10.1. Die Rho-Rock-Signalkaskade

Rho-Kinasen (ROCK) sind Serin/Threonin-Kinasen mit zwei ähnlichen Unterformen. ROCK1 findet sich in Herz, Lunge und anderem nicht-neuronalem Gewebe; ROCK2 hingegen findet sich im ZNS und in Muskeln (Nakagawa et al. 1996). Die Zielproteine von ROCK werden durch Phosphorylierung reguliert und spielen eine wichtige Rolle für Zellform, Zellzyklus, Apoptose und axonales Wachstum (Tönges et al. 2011). Dabei ist ROCK unter anderem über die LIM-Kinase (LIMK) in der Lage, das axonale Wachstum zu inhibieren oder mit Leichtketten-Myosin als direktem Substrat eine Kontraktion des Aktomyosins hervorzurufen (Amano et al. 1996; Maekawa 1999; Ng und Luo 2004). ROCK aktiviert außerdem direkt das *phosphatase and tensin homologue* (PTEN), welches zu einer verminderten Proteinbiosynthese und Zellwachstum in betroffenen Zellen führt (Shi und Wei 2007; Park et al. 2010). Von diesen drei Signalkaskaden scheint die über LIMK, Cofilin und schließlich Aktin (AKT) vermittelte Destabilisierung des Zytoskeletts die wichtigste zu sein, da eine direkte Hemmung der LIMK zu ähnlichen Effekten führt wie eine Hemmung von ROCK, jedoch nur eine ROCK-Inhibition das Zellüberleben von verletzten Neuronen verlängern konnte (Koch et al. 2014). Dies könnte durch die Tatsache bedingt sein, dass ROCK2-Aktivierung neben den beschriebenen Mechanismen auch eine Erhöhung von Calpain verursacht, welches bei axonaler Degeneration durch Kalziumeinstrom ebenfalls erhöht wird. ROCK2 ist somit als ein Hauptregulator von axonaler Degeneration sowie axonalem Wachstum und Zellüberleben anzusehen (Koch et al. 2014).

### 1.10.2. Der ROCK-Inhibitor Fasudil

Fasudil (HA1077/AT877) (1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)homopiperazine) ist ein Chinolin-basierender Ligand, welcher ROCK kompetitiv an der ATP-Bindungsstelle hemmt (Jacobs et al. 2005). In Japan wurde Fasudil ursprünglich auf Grund seiner starken vasodilatatorischen Wirkung zur Prävention von Vasospasmen in der Behandlung nach einer Subarachnoidalblutung zugelassen; zugleich zeigte es eine gute Verträglichkeit beim Menschen (Zhao et al. 2006; Zhao et al. 2011). In der Behandlung von Patienten mit Rechtsherzversagen und konsekutivem Bluthochdruck im Lungenkreislauf konnte intravenös appliziertes Fasudil die Sterblichkeit von Patienten senken (Jiang et al. 2015). Auf Grund dieser positiven Ergebnisse sind Medikamentenstudien am Menschen mit Fasudil somit prinzipiell möglich.

### 1.10.3. Auswirkungen von ROCK-Inhibition auf neuronale De- und Regeneration

Zahlreiche Studien mit pharmakologischen Inhibitoren von ROCK, wie Fasudil oder Y-27632, zeigten in verschiedenen Geweben einen positiven Effekt auf das Zellüberleben, die axonale Regeneration und das Wachstum von Neuriten *in vivo* und *in vitro*. Als Grundlage ist die Hemmung der beschriebenen Signalkaskaden anzusehen (Yamashita et al. 2007; Lingor et al. 2008; Tönges et al. 2012; Koch et al. 2014).

Auch klinisch-funktionell konnte die Relevanz von ROCK-Inhibition durch Studien mit rückenmarksgeschädigten Mäusen gezeigt werden (Hara et al. 2000; Dergham et al. 2002). Eine Metaanalyse von 2014 zeigte bei mit ROCK-Inhibitoren behandelten Tieren – trotz eines geschätzten *publication bias* von ungefähr einem Drittel - ein um 15% verbessertes funktionelles Ergebnis bei behandelten Tieren (Watzlawick et al. 2014).

### 1.10.4. ROCK-Inhibition im SOD-G93A-Mausmodell der ALS

Bezüglich des SOD-G93A-Mausmodells konnte in Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe und anderen Studien gezeigt werden, dass eine präsymptomatische Behandlung der transgenen Mäuse ab Lebenstag 50 mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil (in einer Konzentration von 30 mg/kg Körpergewicht), sowohl einen Überlebensvorteil als auch eine Verbesserung der motorischen Leistungsfähigkeit bewirkt. Hinzu kommt, dass die Aktivierung von Mikrogliazellen im ZNS verlangsamt wird (Takata et al. 2013; Tönges et al. 2013; Günther et al. 2017). Bei einer



symptomatischen Behandlung ab Lebensstag 80 oder einer Behandlung mit einer höheren täglichen Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht konnten diese Ergebnisse in unserer Arbeitsgruppe nicht repliziert werden (Günther 2015); in der Studie von Takata et al. 2013 hatte diese Dosis einen positiven Effekt gezeigt.

### **1.11. Zielsetzung der Arbeit und Studiendesign**

In einer vorangegangenen Studie konnte die neuroprotektive Wirkung von Fasudil in vitro und in vivo bereits belegt und in einer weiteren Studie der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Paul Lingor und Prof. Dr. Lars Tönges erneut bestätigt werden (Takata et al. 2013; Günther et al. 2017).

Ziel des ersten Teils der Studie ist zu erforschen, ob eine präsymptomatische Kombinationsbehandlung mit Fasudil und Riluzol die positiven Effekte der beiden Substanzen kombiniert und am SOD-G93A-Mausmodell, verglichen mit einer mit Wasser behandelten Kontrollgruppe, zu einer Verbesserung des Überlebens bzw. der kognitiven oder motorischen Leistung führt. Außerdem werden in zwei weiteren Versuchsgruppen, welche in Monotherapie mit Fasudil bzw. Riluzol behandelt werden, die bereits beschriebenen positiven Effekte für Riluzol und Fasudil überprüft. Weiterhin soll gezeigt werden, dass die *SOD*-Mutation – wie vorbeschrieben – nicht zu Einbußen der Gedächtnisleistungen führt und sich daher die transgenen Versuchstiere, unabhängig von ihrer Behandlung, in dieser Hinsicht nicht von einer Kontrollgruppe aus Wildtypieren unterscheiden. Das Studiendesign entspricht einer kontrolliert randomisierten Behandlungsstudie.

Der zweite Teil der Studie wird als kontrollierte, randomisierte Querschnittsstudie konzipiert und dient der Fragestellung, ob eine präsymptomatische Kombinationsbehandlung mit Fasudil und Riluzol bzw. eine Monotherapie einer der beiden Substanzen am SOD-G93A-Mausmodell zu einer Erhaltung der Motoneurone im Rückenmark führt. Dafür wird eine weitere Kohorte Mäuse in selbiger Art und Weise wie im ersten Teil des Experiments in drei Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe aufgeteilt und ebenfalls präsymptomatisch behandelt. Im mittleren Teil der klinischen Erkrankung werden die Tiere an Lebensstag 120 getötet und das Rückenmark auf histologische Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe untersucht.

### 1.11.1. Hypothesen des Experiments

1. Mäuse aus dem SOD1-G93A-ALS-Mausmodell leben länger, wenn sie präsymptomatisch mit einer Kombination von Riluzol und Fasudil behandelt werden.
2. Mäuse aus dem SOD-G93A-ALS-Mausmodell profitieren hinsichtlich ihrer motorischen Leistungsfähigkeit davon, dass sie präsymptomatisch mit einer Kombination von Riluzol und Fasudil behandelt werden.
3. Die Gedächtnisleistung der Versuchstiere aus dem SOD-G93A-ALS-Mausmodell ist im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe aus Wildtypen nicht eingeschränkt.
4. Der neuronale Untergang der alpha-Motoneurone im Rückenmark von Mäusen aus dem SOD-G93A-ALS-Mausmodell ist bei präsymptomatischer Kombinationsbehandlung mit Fasudil und Riluzol weniger stark ausgeprägt als bei einer mit Wasser behandelten Kontrollgruppe.

## 2. Methodik und Material

### 2.1. Standardmaterialien

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

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

pH-Meter	pH-Meter PD20, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Pipetten 0,2-2 µl, 1-10 µl, 2-20 µl, 20-100 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl	Pipetman Classic P2, P10, P20, P100, P200, P1000; Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Schwenktisch	Stuart 3D gyratory rockers - SSM3, Bibby Scientific Limited, Stone, Vereinigtes Königreich
Vortex Reagenzglasnischer	7-2020, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	3043, Köttermann GmbH & Co KG, Hänigsen, Deutschland
<b>Verbrauchsmaterialien/ allgemeine Chemikalien</b>	<b>Bezugsquelle / Hersteller</b>
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
Phosphate buffered solution	A0964, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen ohne Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagenzröhre (25 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Safe-Lock-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

**Tabelle 1: Standardmaterialien**

## 2.2. Versuchsgruppen

Es wurden drei Behandlungsgruppen und eine Kontrollgruppe definiert. Die Zuteilung der Tiere auf die Gruppen erfolgte nach dem Zufall, wobei genau darauf geachtet wurde, dass Geschwister aus einem Wurf in unterschiedliche Behandlungsgruppen eingeteilt wurden. Außerdem wurde der Untersucher hinsichtlich der Behandlungsgruppen bis zum Abschluss der statistischen Auswertung verblindet.

Die erste Gruppe wurde mit Fasudil 30 mg/kg Körpergewicht pro Tag behandelt (Fas30). Gruppe 2 wurde mit Riluzol 30 mg/kg Körpergewicht pro Tag behandelt (Ril30). Gruppe 3 wurde sowohl mit Fasudil als auch mit Riluzol mit jeweils 30 mg/kg Körpergewicht pro Tag behandelt (FasRil30). Gruppe 4 diente als Kontrollgruppe und erhielt lediglich normales Trinkwasser (H<sub>2</sub>O). Alle Gruppen umfassten 14 Versuchstiere. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle eine Gruppe von fünf Wildtyp-Tieren in das Experiment eingeschlossen (WT).

<b>Behandlungsgruppe</b>	<b>Behandlungssubstanz</b>	<b>Anzahl der Versuchstiere</b>
Gruppe 1	Fasudil 30 mg/kg Körpergewicht pro Tag	14
Gruppe 2	Riluzol 30 mg/kg Körpergewicht pro Tag	14
Gruppe 3	Fasudil und Riluzol jeweils 30 mg/kg Körpergewicht pro Tag	14
Gruppe 4	Trinkwasser	14

**Tabelle 2: Übersicht über die vier Behandlungsgruppen**

## 2.3. Tierzucht und Mauslinie

Alle Tierexperimente wurden nach Grundlagen und Regeln des Forschungsrates und der Gesetzgebung des Bundeslandes Niedersachsen durchgeführt. Der entsprechende Tierversuchsantrag ist im Anhang beigefügt. Der Untersucher erfüllte die gesetzlichen Vorschriften zum Durchführen von Tierversuchen.

Der genetische Hintergrund der verwendeten Mauslinie war, wie in der Einleitung beschrieben, der High-copy B6SJL-Tg(SOD1-G93A)<sup>1</sup>Gur/J Genotyp (Mausstamm Nummer 002726, Jackson Labs, Bar Harbor, USA). Für die Zucht wurden zunächst transgene SOD1-G93A-Böcke mit 12 Wildtyp-Weibchen der Linie B6SJLF1/J (Mausstamm Nummer 100012, Jackson Labs, Bar

Harbor, USA) in der Zentralen Tierexperimentellen Einheit der Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland (nachfolgend abgekürzt mit „ZTE“) verpaart. Die Verpaarung erfolgte jeweils mit einem Bock und zwei Weibchen, wobei einer der vier Böcke auf Grund starker Aggressionen gegenüber den Weibchen nicht zum Züchten geeignet war und aus dem Experiment ausgeschlossen wurde. Weiterhin wurde die Zucht so ausgelegt, dass die Würfe möglichst zeitgleich erfolgten, sodass die Nachkommen später gleich alt waren und somit an den gleichen Tagen getestet werden konnten.

Im Verlauf des Experiments musste für die Zucht auf transgene Böcke der F1-Generation zurückgegriffen werden, die dafür mit den Weibchen der Elterngeneration verpaart wurden. Dabei wurde sichergestellt, dass die Tiere nicht miteinander verwandt waren, um eine Inzucht auszuschließen. Dieses Vorgehen ist ein gängiges Verfahren in der Aufrechterhaltung von SOD-Mauskolonien, da die Zeitspanne, in der die männlichen Tiere furchtbar sind, nur ca. einen Monat beträgt.

Innerhalb der Nachkommen tritt die SOD-G93A-Mutation auf Grund der heterozygoten männlichen Mutationsträger und der homozygoten Wildtyp-Weibchen mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% auf. Da die Mutation einem dominanten Erbgang folgt, erkranken alle Mäuse, welche die Mutation tragen.

Zur Identifizierung der transgenen Nachkommen wurden am 14. Lebenstag der Tiere durch die Tierpfleger der ZTE Schwanzspitzenbiopsien von 3 mm Länge entnommen. Diese wurden mit Hilfe der im Anschluss beschriebenen Polymerasekettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese auf die Mutation hin untersucht.

## **2.4. Die Genotypisierung**

Für die Genotypisierung wurden die Schwanzspitzen aus der ZTE in die experimentelle Einrichtung (Neurobiologisches Labor Prof. Bähr, Waldweg 33, Göttingen, Deutschland) geschickt. Hier wurden diese jeweils zur Extraktion der DNA mit 200 µl Extraktionslösung (0.2 mg/ml Proteinase K, 0.2% SDS und 5 mM EDTA in PBS (*phosphate-buffered solution*)) für 12 Stunden bei 55 °C inkubiert. Danach wurde die Proteinase K-Aktivität gestoppt, indem die Temperatur auf 85 °C für 45 Minuten erhöht und damit das Protein denaturiert wurde. Nachdem die Proben einzeln mit einer Vortex-Maschine durchgemischt worden waren, wurde jeweils 200 µl der Lösung zusammen mit 1 µl des 100 nM Primers (jeder Primer ist spezifisch für das

menschliche *SOD1*-Gen bzw. für das menschliche *Interleukin*-Gen (*IL*): hSOD1-forward, CAATGTGACTGCTGACAAAG; hSOD1-reverse, GTGCGGCCAATGATGCAAT; IL 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT,

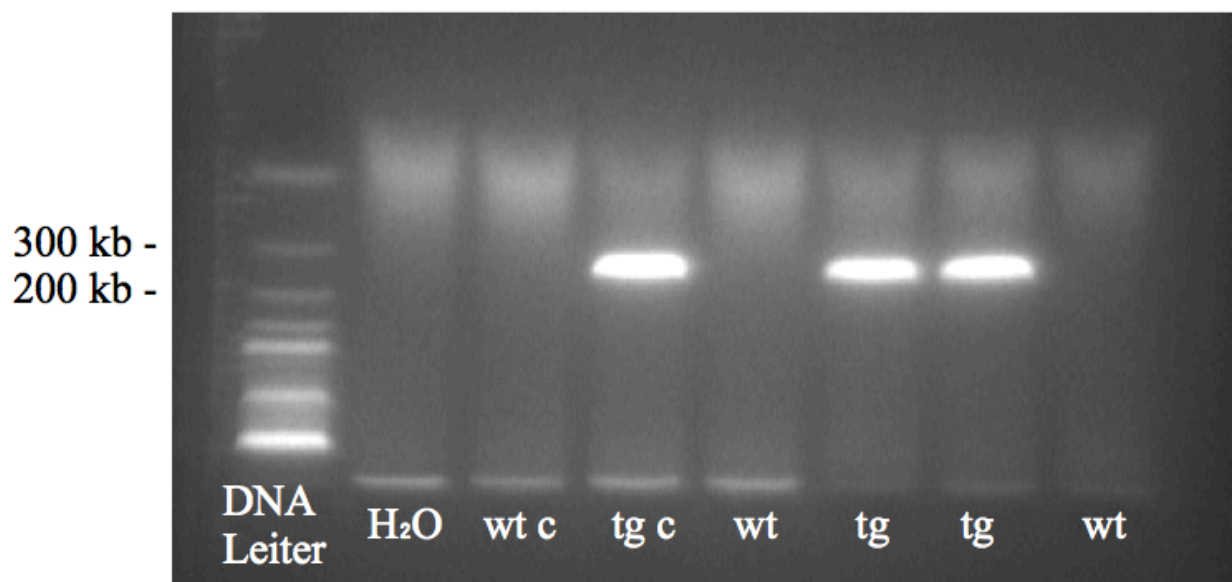
IL Reverse 5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC), 200 µl dNTPs, 1 µl Taq-Polymerase (Rekombinante DNA-Polymerase, interne Laborherstellung) und 1290 µl sterilem Wasser vermischt. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde danach mit der „iCycler real time PCR machine“ durchgeführt: Ein Zyklus 94 °C, 5 min; 35 Zyklen a 94 °C, 30 sec, 58 °C 30 sec, 72 °C 60 sec und als letztes ein Zyklus 72 °C 5 min.

Nach der PCR folgte die Darstellung der spezifischen *SOD* und *IL* Banden durch eine Gelelektrophorese auf einem 1,5% Agarose-Gel. Das menschliche *IL* Genprodukt, welches als Positivkontrolle diente, wird bei 324 Basenpaaren (BP) visualisiert; das *SOD1*-Genprodukt, falls vorhanden, bei 236 BP.

Hierzu wurden die Reaktionsgefäße mit 3 µl Ladepuffer (15 % Ficoll 400 DL, 100 mM LiCl, 100 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), 0,05 ml Bromphenol in 50 ml H<sub>2</sub>O) versetzt und erneut mit einer Vortex-Maschine durchmischt.

Für die Herstellung des 1,5% Agarosegels wurden 1,2 g Agarose (AppliChem, Darmstadt) in 60 ml TBE (1x Tris-Base-EDTA-Puffer) in einem Erlenmeyerkolben in einer Mikrowelle durch kurzes Sieden gelöst und anschließend 1,2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) hinzugegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Das flüssige Gel wurde nun in einen Gelschlitten (BioRad Laboratories, München) gegossen und zwei passende Kämmen (BioRad Laboratories, München) zur Taschenformung eingetaucht. Nach circa einer Stunde ist das Gel ausgehärtet und wurde in eine Gelelektrophoresekammer (BioRad Laboratories, München; Pufferflüssigkeit = TBE) eingesetzt. In die Geltaschen wurde nun mit jeweils 15 µl einer Probe pipettiert, und die Gelelektrophorese für ca. 40 Minuten bei 80 Volt durchgeführt. Bei dieser Methode werden die DNA-Fragmente elektrophoretisch nach ihrer Länge aufgetrennt. Durch das Anlegen einer Spannung an das Gel wandert die negativ geladene DNA zur positiven Elektrode. Die Gelmatrix dient dabei als Gitternetzwerk, durch das die DNA-Fragmente je nach Größe langsamer oder schneller wandern. Eine mitlaufende DNA-Leiter (100 ng/µl, Dianova, Hamburg) mit verschiedenen großen Fragmenten dient als Marker für bestimmte Orte im Gel, bei denen sich DNA-Fragmente spezifischer DNA-Länge befinden. Durch die Bindung von Ethidiumbromid an die DNA kann das zu bestimmende DNA-Molekül unter UV-Licht und mit Hilfe eines an eine Kamera angeschlossenen Computers und dem

Computerprogramm Quantity-One 4.2.2 (BioRad Laboratories, München) detektiert werden. Bei der Arbeit mit dem krebserregenden Ethidiumbromid wurden zum Arbeitsschutz spezielle Handschuhe und gesonderte Pipetten benutzt; außerdem wurden die Materialien gesondert entsorgt. Das Genprodukt einer SOD-G93A-Mutante wurde schließlich anhand einer DNA-Bande im Bereich von 236 Kilobasen identifiziert. Wildtyp-Tiere haben an dieser Stelle keine spezifische Bande. Die generelle Analysemethodik wurde identisch zu den Vorexperimenten von Günther (2015) durchgeführt.



**Abbildung 4: Quantifizierung des SOD-Genprodukts mittels Gelelektrophorese**

DNA Leiter mit Markierungen für 200 und 300 Kilobasen; H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle Wasser; wt c = Negativkontrolle Wildtyp; tg c = transgene Positivkontrolle; wt = Wildtyp; tg = transgenes Tier. Modifiziert nach Günther 2015.

## 2.5. Tierhaltung und Applikation der Versuchssubstanzen

An ihrem 30. Lebenstag wurden die Tiere aus der ZTE in die experimentelle Einrichtung (Neurobiologisches Labor Prof. Bähr, Waldweg 33, Göttingen, Deutschland) transferiert. Vor Ort wurden sie neu auf IVC-Käfige (*individually ventilated cage*) je nach zukünftiger Behandlungsgruppe aufgeteilt. Dies erfolgte mindestens eine Woche vor dem Beginn der verschiedenen Tests, damit sich die Tiere aneinander gewöhnen konnten und dadurch bestmögliche experimentelle Bedingungen gewährleistet wurden. Die Käfige und die dazugehörigen Trinkflaschen waren jeweils mit den Buchstaben A-D, entsprechend der Gruppe markiert.



Die Versorgung der Tiere und Reinigung der Käfige wurde durch die Tierpflegerinnen und -ärztinnen der ZTE übernommen. Durch die separate Käfigventilation waren die Luftfeuchtigkeit und Temperatur stets konstant. Auch der Versuchsraum selbst wurde stets bei konstanter Luftfeuchtigkeit von 60% und 23 °C Raumtemperatur gehalten. Eine Frischluftanlage sorgte für den Austausch der kompletten Raumluft alle 60 Sekunden. Die Tiere erhielten eine vollwertige Alleinfuttermischung (ssniff, Soest) als Futter, welche als Trockenpellets durch die Gitterabdeckungen unbegrenzt erreichbar zur Verfügung stand.

Die Versuchssubstanzen wurden jeweils im Trinkwasser gelöst und die Flüssigkeitszufuhr wurde über Trinkbehälter an den Käfigen ermöglicht, wobei diese regelmäßig vom Untersucher selbst kontrolliert wurden. Die Wasserflaschen wurden wöchentlich mit frischem Wasser und den darin gelösten Substanzen aufgefüllt. Dabei wurde auf die Erfahrung aus vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe zurückgegriffen, dass die Mäuse im Mittel 20 Gramm wiegen und pro Tag 4 ml Wasser trinken. Der Trinkflaschenwechsel erfolgte im Sinne der Verblindung nicht durch den Untersucher selbst.

Im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf (ab einem klinischen Score von 2 – siehe 2.6.) wurden die Pellets mit Wasser zu Brei aufgeweicht und in einer Plastikschaale am Käfigboden platziert, um den durch Lähmung funktionell beeinträchtigten Tieren die Nahrungs- und Flüssigkeitszufuhr zu erleichtern. Dieses Vorgehen entspricht dem der Vorexperimente der Arbeitsgruppe (Günther 2015).

## **2.6. Bestimmung eines klinischen Punktesystems als Verlaufsparemeter der Erkrankung und des Überlebens**

Zur klinischen Bestimmung des Krankheitsbeginns, zur Verlaufskontrolle der Erkrankung und zur statistischen Vergleichbarkeit von Schwere und Progress der Erkrankung zwischen den Behandlungsgruppen wurde ein klinisch-neurologischer Untersuchungsbefund (*clinical score*) nach Weydt et al. (2003) alle drei Tage wie folgt erhoben:

**4 Punkte** - keinerlei neurologische Defizite, wildtypähnliche Verhaltensweise, vollständige Bein Streckung/-spreizung weg von der lateralen Mittellinie, während die Maus kopfüber am Schwanz gehalten wird.

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

**2 Punkte** - Gestörtes Gangbild im Sinne eines „Watschelgangs“, Gang auf allen vier Extremitäten noch möglich. Ab diesem Punktwert werden Futterpellets mit Wasser zu Brei aufgeweicht und in einer Plastischale am Käfigboden platziert.

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

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

Der Score wurde während des kompletten Versuchs vom gleichen Untersucher erhoben, um unterschiedliche subjektive Betrachtungsweisen auszuschließen.

#### 2.6.1. Krankheitsbeginn und Beginn der schweren Erkrankung

Der Krankheitsbeginn wurde auf den ersten Testtag festgelegt, an dem eine Maus einen klinischen Score von 3 erreicht hat und somit zum ersten Mal Krankheitszeichen zeigte. Wenn eine Maus einen Score von 2 direkt nach einem Score von 4 aufwies, wurde dieser Testtag als Krankheitsbeginn gewertet. Der Beginn der schweren Erkrankung entspricht dem Testtag, an dem eine Maus zum ersten Mal einen klinischen Score von 2 aufwies und somit erste Lähmungszeichen zeigte. Ab diesem Punkt wurde das klinisch-neurologische Untersuchungsintervall auf 24 Stunden verkürzt, um mögliche Abbruchkriterien genauer feststellen zu können.

## 2.6.2. Überleben und Versuchsende

Nach dem zuvor beschriebenen Punkteschema des klinischen Status wurde bei Erreichen des Punktwertes Null ein sofortiges Einschläfern des Versuchstiers mittels CO<sub>2</sub> durchgeführt. Die Anzahl der Tage von Geburt bis zu diesem Tag geht als Überlebenszeit in die statistische Auswertung ein und stellt damit die erreichte Lebenszeit des Tieres dar.

## 2.7. Klinisch funktionelle Testmethoden

### 2.7.1. Drehwalzentest Rotarod

Wie in der Einleitung beschrieben, dient der Drehwalzentest zur Analyse der motorischen und koordinativen Leistungsfähigkeit der Mäuse und hat sich sowohl in der Literatur als auch in vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe als effizientes Tool zur Detektion von motorischen Ausfällen bewiesen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die motorische Leistungsfähigkeit der Versuchstiere nach einer kurzen Zeit der Eingewöhnung an das Rotarod konstant bleibt und es zum Versuchsbeginn keine Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe gibt. Mit Beginn der Erkrankung wurde erwartet, dass die Behandlung mit Fasudil, Riluzol und der Kombination aus beiden Stoffen dazu führt, dass die Laufleistung der Mäuse auf dem Rotarod im Vergleich zur Kontrollgruppe erst später abnimmt und dass sie im Verlauf des Experiments durchschnittlich länger auf dem RotaRod laufen können.

Ab dem 50. Lebenstag der Mäuse wurden diese zwei Mal pro Woche auf einem Rotarod (Rotarod for mice 47600, UGO BASILE, Comerio, Italien) getestet. Dies entspricht Lebenstag 50, 53, 57, 60, 64, 67, 71, 74, 78, 81, 85, 88, 92, 95, 99, 102, 106, 109, 113, 116, 120, 123, 127, 130, 134, 137, 141, 144, 148 und 151.

Der Aufbau des Tests wurde dabei im Vergleich zu Miyagishi et al. (2012), Fischer et al. (2004), Miana Mena et al. (2009), Alves et al. (2011) und Günther (2015) von einer konstanten Umdrehungszahl zu einer sich beschleunigenden Umdrehungszahl der Walze verändert, ähnlich wie in der Arbeit von Klivenyi et al. (1999) oder Mead et al. (2011). Die Mäuse wurden auf eine geriffelte Walze aus Gummi gesetzt, welche von zwei Umdrehungen pro Minute kontinuierlich über eine Zeit von fünf Minuten auf 30 Umdrehungen pro Minute beschleunigt wurde, sodass die Tiere zunächst langsam und dann schneller vorwärts laufen mussten, um sich auf der Walze zu

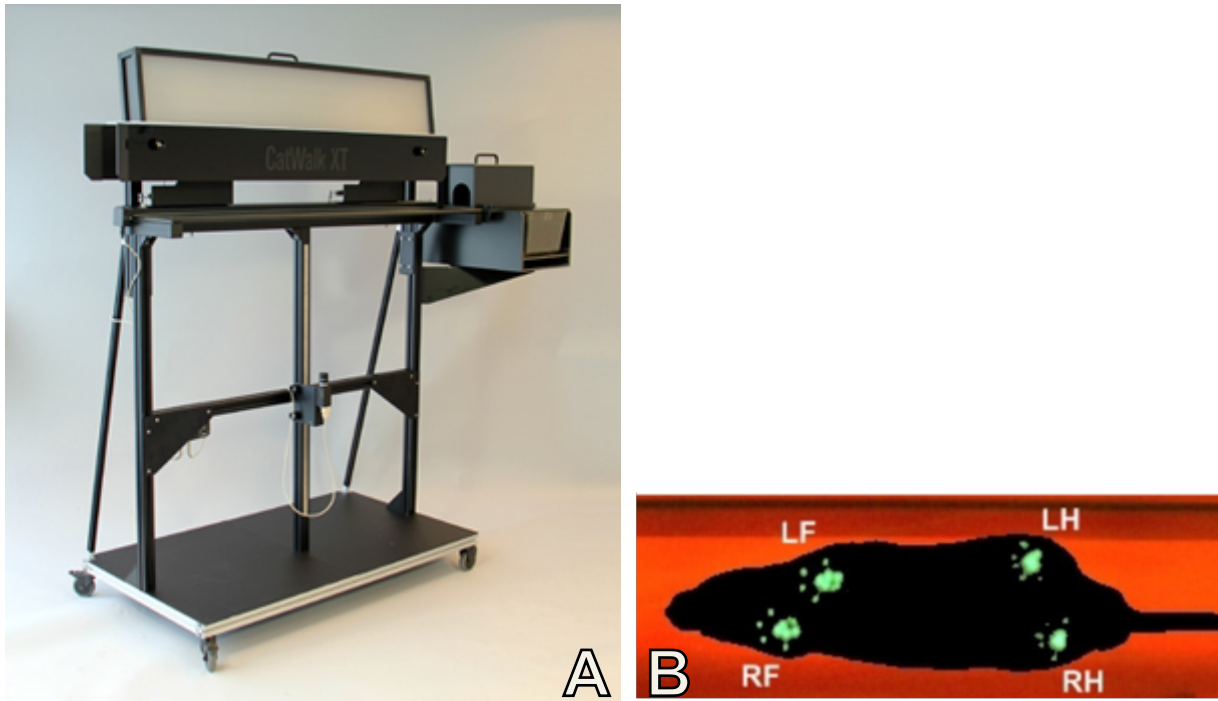
halten. Wenn die Mäuse erschöpft vom Laufen waren und sich daher nicht mehr auf der Walze halten konnten, fielen sie von der Walze auf eine 2cm tiefer liegende, weiche Unterlage. Bei diesem Versuch wurde die Zeit, welche die Maus insgesamt auf der Walze verbringt, durch eine automatische Stoppuhr gestoppt. An jedem Testtag durchläuft eine Maus jeweils drei Durchgänge, wobei jede Maus zwischen den Durchgängen eine Mindestzeit von 20 Minuten zum Erholen hatte. So wurde sichergestellt, dass die Mäuse die weiteren Läufe nicht schon erschöpft antraten. Der Mittelwert aus allen drei Durchgängen diente als Tagestestwert für die jeweilige Maus. Das Abbruchkriterium des Tests war erreicht, wenn sich die Maus vor dem Beginn des Tests, also bei stillstehender Walze, nicht mehr von allein auf der Walze halten konnte.

Von diesem Versuchsaufbau wurde erwartet, dass er durch die höhere Drehzahl gegen Ende des Versuchs eine größere Herausforderung zu Beginn des Experiments für die noch gesunden Mäuse bietet. Außerdem wurde erwartet, dass er durch die kleinere Drehzahl am Anfang des Versuches auch bereits erkrankten Tieren die Möglichkeit gab, sich zu Beginn noch auf der Walze zu halten, ohne direkt herunterzufallen. Insgesamt wurde also eine größere Differenzierung der motorischen und koordinativen Leistungsfähigkeit angestrebt; dies mit dem Ziel der früheren Detektion von motorischen Ausfällen und einer besseren Verlaufsbeurteilung der erkrankten Tiere.

## 2.7.2. Ganganalyse-Test „Catwalk XT“

### 2.7.2.1. Versuchsaufbau und Durchführung der Aufzeichnung des Gangbildes

Der Catwalk XT<sup>TM</sup> (Noldus, Wageningen, Niederlande) bestand aus einer zwei Meter langen und ca. 10 cm breiten Glasplatte, welche von ihrer langen Seite aus mit einer grünen Lampe durchleuchtet wurde. Oberhalb der Glasplatte waren zwei bewegliche Wände befestigt, die in einem Abstand von 4 cm zueinander eingestellt wurden, sodass ein Laufweg zwischen ihnen entstand. Der Laufweg war an den beiden kurzen Seiten durch einsetzbare Gitter begrenzt, sodass die Mäuse zwar wenden und hin und her laufen konnten, es ihnen aber nicht möglich war, den Laufweg zu verlassen. Über den beiden Wänden und somit 10 cm über der Glasplatte befand sich eine hochklappbare, rot leuchtende Fläche. Einen Meter unterhalb der Glasplatte war eine Kamera befestigt, welche den kompletten Laufweg von unten filmte und das Bild in Echtzeit an einen angeschlossenen Computer übertrug. Die Messungen fanden in einem dunklen und geräuschfreien Raum statt.



#### **Abbildung 5: Catwalk XT**

Teil A zeigt den Ganganalyseapparat Catwalk XT. Die obere Lampe ist ausgeschaltet und hochgeklappt. Darunter befindet sich die Glasplatte mit zwei seitlichen Begrenzungen. Der rechts im Bild befindliche Tierstall wurde für dieses Experiment nicht verwendet. B zeigt den Analysevorgang mit bereits markierten Pfotenabdrücken (LF = Linker Vorderfuß, RF = Rechter Vorderfuß, LH= Linker Hinterfuß, RH = Rechter Hinterfuß).

Mit Beginn am 50. Lebenstag wurde einmal pro Woche das Gangbild der Versuchstiere mit dem Catwalk aufgezeichnet. Für die Gangbildaufzeichnung wurden die Tiere innerhalb des Laufkäfigs auf die eine Seite der Glasplatte gesetzt, sodass sie die Strecke von selber hin und her ablaufen konnten. Durch die grüne Beleuchtung der Glasplatte durch die Lampe von der Seite erzeugten die Pfoten der Tiere bei Berührung der Glasplatte einen gut sichtbaren grünen Abdruck, welcher je nach Aufdruckstärke bzw. Gewicht der Tiere variierte. Die Kamera zeichnete diese Abdrücke und damit den Laufweg der Maus in Echtzeit auf.

Es wurden pro Untersuchungstag für jede Maus drei Durchläufe aufgezeichnet, welche vom Computer sofort hinsichtlich möglicher Ausschlusskriterien analysiert wurden. Diese waren erstens eine ungleichmäßige Laufgeschwindigkeit (mehr als 70% Abweichung vom Mittelwert der Laufgeschwindigkeit während der Aufzeichnung), zweitens ein Unterschreiten der Mindestlaufgeschwindigkeit (weniger als 3 cm/s) und drittens ein Überschreiten der Maximallaufgeschwindigkeit (mehr als 50 cm/s). Diese Kriterien sorgten dafür, dass Läufe, bei denen später eine Analyse des Gangbildes nicht möglich gewesen wäre (wie z. B. in denen die Maus während des Laufens anhält und erst später weiterläuft), vom Computer sofort automatisch

ausgeschlossen wurden. Die Maus wurde während des Experiments so lange ungestört auf der Glasplatte sitzen gelassen, bis drei Läufe zusammengekommen waren, die den oben genannten Kriterien entsprachen. Dies dauerte in der Regel nicht länger als fünf Minuten pro Maus. Die Tiere wurden dabei nicht von außen beeinflusst.

Das Abbruchkriterium des Tests war erreicht, wenn die Maus innerhalb von zehn Minuten nicht mehr in der Lage war, einen Lauf zu absolvieren, der den vorgegebenen Parametern entsprach, oder älter war als Lebenstag 127.

#### 2.7.2.2. Analyse des Gangbildes mit der Software Noldus Catwalk XT

Nach Aufzeichnung und Abschluss der drei Testläufe pro Testtag und Maus wurden diese mit Hilfe der Software Noldus Catwalk XT (Noldus Information Technology, Software Version 9.1) ausgewertet. Dafür wurden zunächst von der Software automatisch die Fußabdrücke, die Nasenspitze und der Schwanz der Maus erkannt und zugeordnet. Diese Zuordnung wurde danach manuell auf ihre Korrektheit überprüft. Einzelne, von der Software falsch oder nicht erkannte Abdrücke wurden manuell korrigiert bzw. ergänzt. Im Anschluss wurden die Aufzeichnungen im Hinblick auf verschiedene Parameter durch die Software automatisch analysiert. Die drei Testläufe pro Testtag und Maus wurden für jeden Parameter in einem Mittelwert zusammengefasst und die Ergebnisse automatisch in einer Excel-Tabelle ausgegeben.

#### 2.7.2.3. Verwendete Parameter des Gangbildes

Wie eingangs beschrieben, lag der Fokus der Auswertungen auf den Parametern, welche bereits in vorangegangenen Experimenten mit SOD-G93A-Mäusen verwendet worden waren. Dies waren die Schrittlänge der Vorderbeine (*stride length*), die Fläche der Fußabdrücke der Hinterfüße (*print area*) und die Schrittzeit (*swing speed*) (Mead et al. 2011). Hinzu kam die Dauer eines Laufs (*run duration*) (Knippenberg et al. 2010). Die Schrittlänge entspricht dem mittleren Abstand der längsten Zehe zu dem Fersenabdruck des gleichen Fußes im darauffolgenden Schritt. Die Fläche der Hinterfüße ist größer als die der Vorderfüße und durch das höhere Gewicht besser zu visualisieren. Sie entspricht der mittleren Fläche aller Fußabdrücke der drei Läufe. Die Schrittzeit entspricht der mittleren Zeit pro Schritt, also vom Abheben eines Fußes bis zum Absetzen desselben Fußes auf der Glasplatte. Die von der Maus benötigte Zeit zum Überqueren der kompletten Glasplatte entspricht der Laufzeit.

Alle vier Parameter waren so konzipiert, dass sie als weitere Methode neben dem Drehwalzentest direkt die klinischen Funktionseinschränkungen der Versuchstiere detektieren und damit indirekt die progressiven Lähmungen im Verlauf beobachten. Die Parameter sind in der Literatur hinsichtlich ihres Verlaufes unterschiedlich beschrieben, sodass sich eine Prädiktion auch an klinischen Überlegungen orientieren sollte. Es ist somit anzunehmen, dass die Schrittlänge im Rahmen der progressiven Lähmungen kontinuierlich abnimmt und die Dauer eines Laufs sowie die Schrittzeit im Verlauf zunehmen. Bezüglich der Fläche der Fußabdrücke kann ebenfalls eine Steigerung angenommen werden, da die distale Extremitätenmuskulatur bei der ALS zuerst von Krankheitssymptomen betroffen ist, und somit die Pfotenmuskulatur nicht mehr in der Lage ist, die einzelnen Zehen zusammenzuhalten.

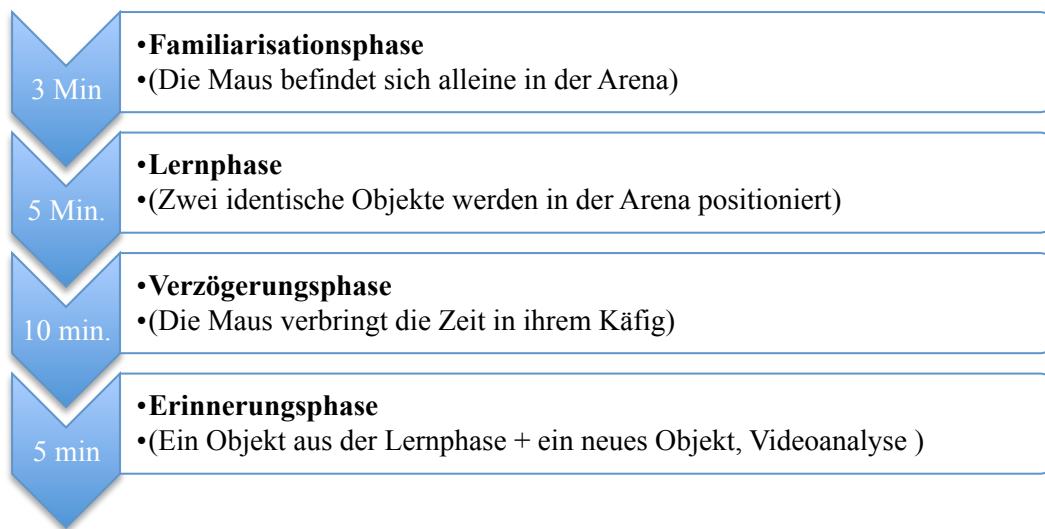
### 2.7.3. Novel Object Recognition Test

Für den Novel Object Recognition Test (NOR) wurde von den UMG-Werkstätten (Humboldtallee 23, Göttingen, Deutschland) eine 1,0 x 1,0 Meter große Box aus grauem Hartplastik hergestellt. In dieser Box wurde auf der einen Seite mittig eine Markierung 10 cm von der Wand der Box entfernt eingezeichnet. Auf diese Markierung wurde später die zu testende Maus am Anfang jedes Durchlaufs mit dem Blick zur Wand – also mit dem Blick entgegengesetzt zu den Testobjekten – gesetzt. Auf der anderen Seite der Box wurde auf beiden Seiten je eine Markierung eingezeichnet, auf die die jeweiligen Objekte während des Tests gesetzt wurden.

Ein Versuchsdurchlauf gliederte sich in 4 Phasen, welche in Abbildung 6 dargestellt sind. Zu Beginn des Versuchs wurde die zu testende Maus für 3 Minuten in die leere Arena gesetzt, damit sie sich an diese gewöhnen kann (Familiarisationsphase). Danach wurden für 5 Minuten zwei identische Objekte zusätzlich zur Maus in der Arena platziert (Lernphase). Nach der Lernphase wurde die Maus für 10 Minuten zurück in ihren Käfig gesetzt (Verzögerungsphase) und die Versuchsarena und die Versuchsobjekte mit Papiertüchern und 70%igem Alkohol sehr gründlich gereinigt, sodass keine Rückstände von Kot oder Urin mehr vorhanden waren. Außerdem diente die Reinigung dazu, dass eventuelle Eigengerüche der Testmäuse beseitigt wurden. Ein „Markieren“ von Bereichen oder Testobjekten durch die Maus wurde somit verhindert. Als vierte und letzte Phase wurden eins der alten Objekte und ein neues Objekt wieder in die Arena gestellt. Danach wurde die Maus wie beschrieben für fünf Minuten in die Arena gesetzt. Nach fünf

Minuten wurde die Maus behutsam aus der Versuchsarena genommen und zurück in ihren Käfig gesetzt.

Als Objekte wurden an Tag 50 zwei große Labor-Glasflaschen (alte Objekte) und eine gelbe Pipettenspitzenbox (neues Objekt), an Tag 88 zwei graue Handschuhboxen (alte Objekte) und ein blauer Messbecher (neues Objekt), an Tag 102 zwei durchsichtige Glaskolben (alte Objekte) und ein quadratischer, undurchsichtiger Kunststoffbehälter (neues Objekt) und an Tag 116 zwei halbdurchsichtige Mineralwasserflaschen (alte Objekte) und ein weiß-grüner Pappkarton gewählt.



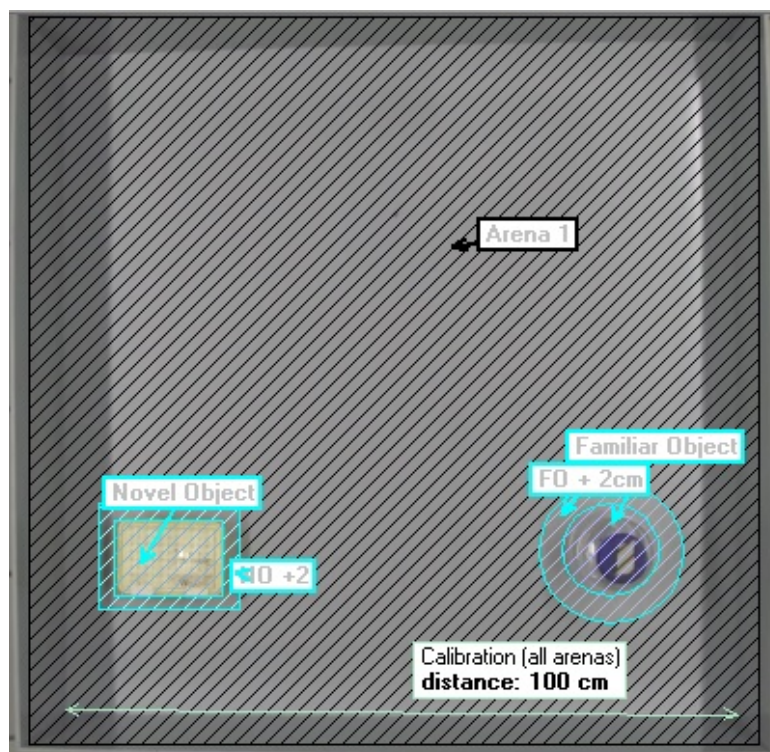
**Abbildung 6: Ablauf der vier Phasen des NOR-Tests**

Die fünfminütige Erinnerungsphase wurde durch eine Kamera live aufgezeichnet. Die Kamera wurde dazu durch ein Stativ sowie einen an der Wand befestigten Draht so positioniert, dass sie sich ca. zwei Meter über der Mitte der Versuchsarena befand. Es wurde dabei darauf geachtet, dass im Bild keine Lichtreflexe vorhanden waren und die Kamera exakt mittig und bei jedem Versuchsdurchgang identisch positioniert wurde. Der Test wurde für jede Maus an den Lebenstagen 50, 88, 102 und 116 durchgeführt.

Die Videos wurden mit der Software Noldus EthoVision XT (Version 8.1, Noldus Information Technology, Wageningen, Niederlande) geschnitten und analysiert. Als Erstes wurde dazu innerhalb des Videos die Zone markiert, welche die Versuchsarena darstellt (vgl. Abbildung 7, schwarz schraffierte Fläche), um mögliche Artefakte zu verhindern. Diese Zone wurde von der Software auf Testmäuse durchsucht, die später in die Berechnung miteinbezogen wurden. Darauf folgte die Definition einer Strecke zur Skalierung. In diesem Versuch wurde dazu die Kantenlänge der Versuchsarena benutzt, welche 100 cm in der Realität entsprach. Danach wurde



jeweils das alte und das neue Objekt mit einer Zone markiert (vgl. Abbildung 7: innere blaue Fläche) und durch die Software eine Zone hinzugefügt, die einen 2-cm-Umkreis um das Objekt bildete.



**Abbildung 7: Versuchsaufbau NOR-Test mit eingezeichneten Analysezon**

Die Abbildung zeigt die Zonen *novel object* bzw. *familiar object*, die vom Computer generierten Analysezon (*NO + 2* bzw. *FO + 2*), die Analysefläche *Arena 1* sowie den Kalibrierungspfeil (*calibration (all arenas)*).

Während der Analyse des Versuchsvideos konnte die Software erkennen, an welcher Position sich die Maus in der Arena befand, und damit errechnen, wie viel und wie schnell sich die Maus während der fünf Minuten bewegte. Außerdem wurde aufgezeichnet, wie oft und wie lange sich die Maus mit ihrer Nasenspitze in den Zonen „Objekt + 2 cm“ aufhielt. Diese Zeit wurde entsprechend dem originalen Versuchsdesigns von Ennaceur und Delacour (1988) als Exploration des Gegenstands gewertet und später als „Diskriminations-Index“ ausgewertet. Als weitere Verlaufparameter wurden die „zurückgelegte Distanz“ (*distance moved*) und die „Zeit ohne Bewegung“ (*time spent immobile*) ausgewertet. Die „zurückgelegte Distanz“ entsprach der von der Maus während der fünfminütigen Erinnerungsphase zurückgelegten Strecke. Die „Zeit ohne Bewegung“ entsprach der Zeit, die von der Maus während der Erinnerungsphase mit Sitzen verbracht wurde. Diese Parameter dienten zum einen dem zusätzlichen Vergleich der

Versuchsgruppen und zum anderen dem Vergleich der unterschiedlichen Testtage um eventuelle Störeinflüsse an bestimmten Tagen zu detektieren.

#### 2.7.4. Bestimmung des Körpergewichts

Vor jedem Drehwalzentest wurde an den entsprechenden Tagen das Gewicht der Versuchstiere in Gramm mit einer Waage und einem Becherglas bestimmt. Die Mäuse wurden einzeln vorsichtig in das Becherglas gesetzt und gewogen. Nachdem eine Maus gewogen worden war, wurde das Becherglas mit Wasser und Alkohol gereinigt und abgetrocknet, um Verfälschungen der weiteren Messungen vorzubeugen. Das Wiegen erfolgte vormittags zu einer standardisierten Zeit, um Fehler durch unterschiedliche Nahrungsmittelaufnahme bzw. unterschiedliches Trinken im Tagesverlauf zu minimieren.

### **2.8. Immunhistologische Quantifizierung von $\alpha$ -Motoneuronen im Rückenmark in einer Querschnittsstudie**

Um zu einem definierten Zeitpunkt (d120) die Anzahl der  $\alpha$ -Motoneurone im Rückenmark zu quantifizieren und damit mögliche Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe festzustellen, wurde eine weitere Kohorte Mäuse gezüchtet, welche in keine anderen Experimente miteinbezogen wurde. Diese Mäuse wurden nach dem schon beschriebenen Prinzip zufällig in Behandlungsgruppen eingeteilt und während der Behandlungsphase regelmäßig untersucht, um den gesundheitlichen Zustand und einen eventuell nötigen Abbruch des Experiments festzustellen. Insgesamt wurden pro Behandlungsgruppe fünf und für die Wildtypgruppe drei Mäuse in das Experiment miteinbezogen.

#### 2.8.1. Entnahme und Präparation des Rückenmarks nach Günther et al. (2012)

An Lebenstag 120 wurden die Mäuse zunächst durch das langsame Einströmen von CO<sub>2</sub> in ihren Käfig betäubt und danach mit einer Paraformaldehyd-Lösung (PFA) perfundiert. Dies erfolgte nach der etablierten Methode von Günther et al. (2012). Hierzu wurde die betäubte Maus zunächst gründlich inspiziert, um einen Atemstillstand festzustellen. Danach wurde durch Kratzen einer Pfote mit einer spitzen Pinzette ein möglicher Schmerzreflex überprüft. Falls dieser noch vorhanden war, wurde weitere 30 Sekunden abgewartet. War der Reflex nicht mehr vorhanden,

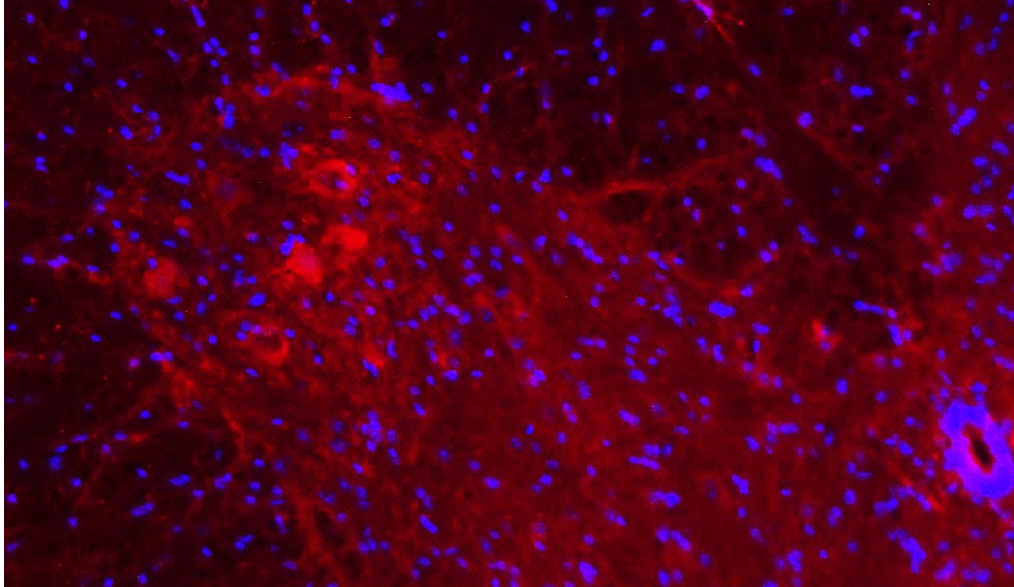
konnte eine sehr tiefe Betäubung angenommen werden. Die Maus wurde als nächstes von ihrem Käfig auf eine Styroporplatte transferiert und durch das Einbringen von Nadeln durch die Pfoten auf einer Unterlage fixiert. Danach wurde das Fell und die Haut durch einen medianen Längsschnitt mit einem scharfen Skalpell („Präzisa Plus“, Dahlhausen, Köln, Deutschland) am Oberbauch durchtrennt. Nach dem Durchtrennen der Rippen mit einer spitzen Schere („Cohan-Vannas Spring Scissors“, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) beidseits wurde das Sternum mit den medialen Teilen der Rippen nach cranial abgeklappt, um das Herz und die Lungen freizulegen. Nun wurden mit einer 18G Flügelkanüle, welche durch einen dünnen Schlauch mit einem Infusomaten verbunden war 100 ml 4 °C kalter Phosphat-Buffer-Solution (PBS) in die freipräparierte, noch schlagende linke Herzkammer eingebracht. Durch gezielte Einschnitte in Nase und Leber der Maus konnte das Blut abfließen und es wurde eine komplette Perfusion sichergestellt. Anschließend erfolgte die Perfusion mit 100 ml einer 4 °C kalten 4%igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA), was zu einer kompletten Erstarrung des Tieres führte. Zur Entnahme des Rückenmarks wurde die Maus nunmehr bäuchlings mit Nadeln auf der Unterlage fixiert und danach dorsal ein medianer Längsschnitt entlang der Wirbelsäule durchgeführt. Die Haut wurde zur Seite geklappt und die Rückenmuskulatur mit einem Skalpell entfernt, sodass die Wirbelbögen sichtbar wurden. Danach wurden diese mit einer gewinkelten Schere soweit lateral wie möglich durchtrennt. Dabei wurden von cranial beginnend die Wirbelbögen bis zum Kreuzbein entfernt, sodass der Spinalkanal eröffnet und damit das Rückenmark freigelegt werden konnte. Nach dem Durchtrennen der Spinalnervenwurzeln mit einer sehr feinen Nadel wurde das Rückenmark entnommen und für eine Stunde in einer PFA-Lösung bei 4 °C. gelagert. Danach erfolgte die Dehydrierung des Gewebes durch die Lagerung in einer 30%igen Saccharoselösung. Die suffiziente Dehydrierung war gegeben, wenn das Rückenmark auf den Boden des Becherglases abgesunken war, was in der Regel nach 15-20 Stunden der Fall war.

Zum Erstellen der transversalen Gewebeschnitte wurde die Intumescencia lumbalis des Rückenmarks mit einem Skalpell abgetrennt, in eine Kryomatrix (Shandon Cyromatrix, Thermo Fisher Scientific Inc, Kalamazoo, Michigan, USA) eingebettet und mit einer Gefrierschnittmaschine „Kryostat“ (CM-3050-S, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland) geschnitten. Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der unterschiedlichen Höhen der Intumescencia lumbalis auf die Objektträger zu gewährleisten, wurden drei Sets mit jeweils fünf Objektträgern verwendet. Die 20 µm dicken Schnitte wurden zunächst im ersten Set

nacheinander auf die Objektträger 1 bis 5 verteilt, sodass der sechste neben dem ersten Schnitt auf Objektträger 1, der siebte neben dem zweiten Schnitt auf Objektträger 2 usw. platziert wurde. Der Abstand zwischen den benachbarten Schnitten auf einem Objektträger betrug auf diese Weise 100 µm und ein Objektträger deckte mit fünf Schnitten somit eine Rückenmarkslänge von 500 µm ab. Das Schneiden der beiden weiteren Sets erfolgte nach dem gleichen Prinzip, sodass insgesamt 1500 µm pro Rückenmark geschnitten wurden.

### 2.8.2. Immunhistochemische Darstellung der $\alpha$ -Motoneurone

Die Objektträger wurden zunächst für 30 Minuten in einem Wärmeschrank bei 60 °C getrocknet. Für eine bessere Haftung der nachfolgend verwendeten Antikörper an den entsprechenden Antigenen wurden die Objektträger für weitere 30 Minuten in 90 °C heißer 10 mM Zitronensäurelösung aufbewahrt. Nach zwei weiteren Spülschritten mit PBS für jeweils fünf Minuten wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem Konturfettstift (Pen, Dako) umrandet, sodass die später verwendeten Lösungen auf dem Objektträger nicht verlaufen konnten. Als nächstes wurden die Schnitte für eine Stunde mit einer Phosphatpufferlösung mit 5% NDS (Normal Donkey Serum, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) und 0,2% TritonX100 (T-8787, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) inkubiert. Nach einem erneuten Abspülen der Objektträger mit PBS und einem dreimal 15-minütigen Waschen der Objektträger in einer mit PBS gefüllten Glasküvette auf einem Schwenktisch wurde der Primärantikörper Anti-ChAT (Choline Acetyltransferase, goat, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) 1:100 aufgetragen und die Objektträger für zwölf Stunden bei 4 °C aufbewahrt. Im Anschluss folgten nach drei weiteren Waschschrritten die Inkubation des fluoreszierenden Sekundärantikörpers Cy3 (donkey anti goat, Dianova, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:300 für eine Stunde in einer abgedunkelten Box bei 4 °C und drei weitere Waschschrritte. Zur Färbung und damit zur eindeutigen Identifikation von Zellkernen wurde eine DAPI-Lösung (4,6-diamidino-2-phenylindole, Sigma-aldrich, St. Louis, Missouri, USA) für fünf Minuten aufgebracht. Danach wurde diese in einem Waschschrtritt von 3 mal 5 Minuten wieder abgespült. Zuletzt wurden die Objektträger mit Mowiol (Hoechst, Frankfurt, Germany) beträufelt und mit einem Deckgläschen eingedeckelt.



**Abbildung 8: Übersichtsdarstellung eines lumbalen Vorderhorns nach ChAT-Färbung**

Es zeigen sich die durch ChAT-AK rot angefärbten alpha Motoneurone sowie deren durch DAPI blau angefärbte Zellkerne.

### 2.8.3. Quantifizierung der $\alpha$ -Motoneurone

Pro Maus wurde aus jedem der drei Schnitt-Sets ein Objektträger zufällig ausgewählt und mikroskopisch ausgewertet. Für die Darstellung der  $\alpha$ -Motoneurone in einem Axioplan Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) wurden ein cy3 Filter (rot) und für Darstellung der Zellkerne ein DAPI Filter (blau) gleichzeitig verwendet. Als  $\alpha$ -Motoneurone wurden alle ChAT-positiven Zellen, die sich anatomisch im Vorderhorn befinden und einen eindeutig im Zellkörper liegenden Zellkern zeigen, definiert und manuell ausgezählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass mindestens 10 Querschnitte, also 20 Vorderhörner pro Tier vorhanden waren. Von jedem Vorderhorn wird mit Hilfe einer Kamera (AxioCam HRm, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) ein Bild angefertigt. Der Mittelwert der Anzahl der Motoneurone über alle Vorderhörner eines Versuchstieres wurde als  $N = 1$  gezählt. Zur statistischen Analyse wurden t-Tests von unverbundenen Stichproben zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe gerechnet.

## **2.9. Analysemethodik**

Während der Versuche wurden die erhobenen Daten auf einem Datenblatt erfasst und danach direkt in ein Excel-Datenblatt übertragen und aufbereitet. Grafiken und Tabellen wurden ebenfalls mit Microsoft Excel für Mac (Version 14.3.0, Microsoft, Redmond, Washington, U.S.A.) erstellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit IBM SPSS Advanced Statistics Version 20.0 (IBM, Armonk, New York, U.S.A.).

Fehlende Werte wurden soweit möglich durch listenweisen Fallausschluss nicht mit in die Analyse miteinbezogen, falls diese weniger als 5% der Gesamtwerte ausmachten. Im NOR-Test wurden fehlende Werte durch statistische Analyse und multiple Imputation ergänzt, um bei einer hohen Rate von fehlenden Werten eine sinnvolle statistische Analyse zu ermöglichen. Überlebensanalysen wurden mittels Log-Rank-Test durchgeführt; für Analysen des Erkrankungsbeginns und des Krankheitsverlaufs wurden auf Grund von konstanten Gruppengrößen Mann-Whitney-U-Tests verwendet.

Für Zeitreihenanalysen wurden ANOVAS mit Messwiederholung verwendet, deren Freiheitsgrade mit einem Mauchly-Test auf Sphärizität überprüft und bei nicht gegebener Varianzgleichheit nach Greenhouse-Geisser korrigiert wurden. Post-hoc-Analysen erfolgten bei Varianzgleichheit mit einem Tukey-Test bzw. bei ungleichen Varianzen mit einem Dunnett-Test.

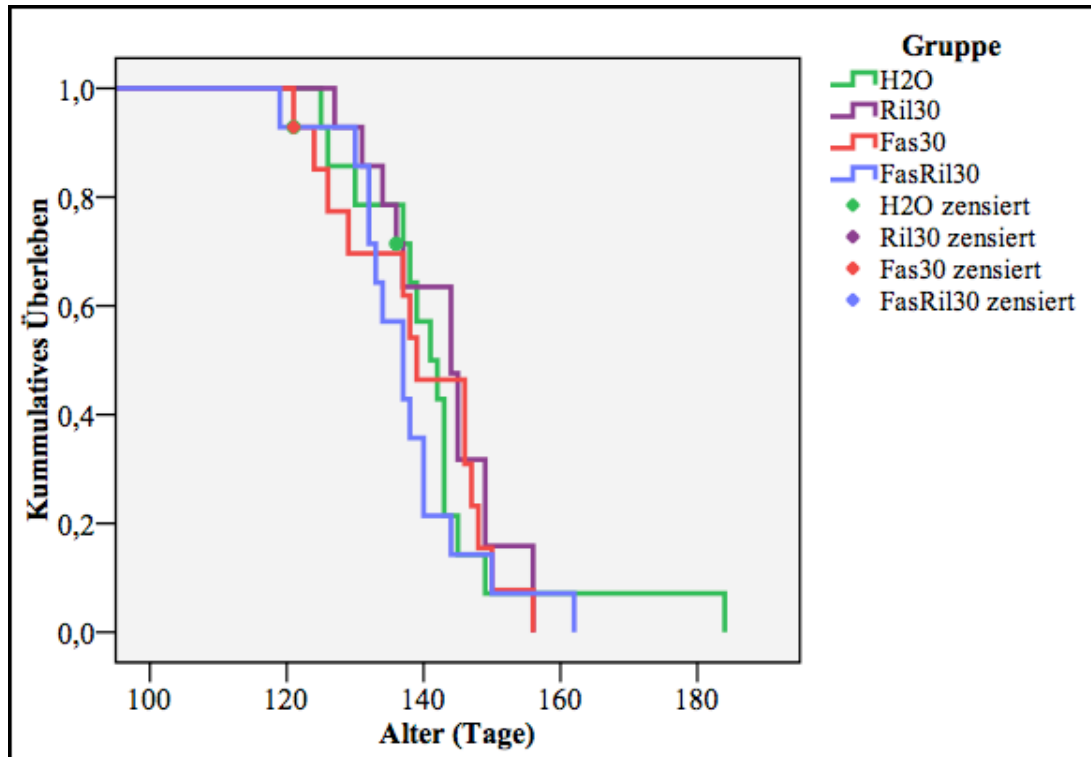
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Überleben

Zur Bestimmung der mittleren Überlebenszeit der Behandlungsgruppen nach einer präsymptomatischen Behandlung ab Lebenstag 50 wurde, wie im Methodenteil beschrieben, für jede Maus der Zeitraum von der Geburt (Tag 0) bis zum Tag des Einschläferns (Todestag) bestimmt. Insgesamt fällt auf, dass die Gruppen im Mittel etwa gleich alt werden, wobei die durchschnittliche Überlebenszeit bei 140 Tagen liegt. Die Ril30-Gruppe lebte im Mittel am längsten (Mean = 143 Tage; SEM = 2.435), die H<sub>2</sub>O-Gruppe am zweitlängsten (Mean = 142 Tage; SEM = 3.754), die Fas30-Gruppe am drittlängsten (Mean = 139; SEM = 3.041) und die FasRil30-Gruppe am kürzesten (Mean = 138; SEM = 2.676). Jeweils ein Tier aus der Ril30-Gruppe und ein Tier aus der Fas30-Gruppe musste an Tag 121 und 134 wegen anderweitiger Krankheit aus dem Versuch genommen werden.

Die grafische Auswertung der Überlebensdaten erfolgte mit einem Kaplan-Meier-Diagramm (vgl. Abbildung 9). Die beiden aus dem Versuch genommenen Tiere wurden in den jeweiligen Kurven zensiert. Deskriptiv konnte festgestellt werden, dass die Überlebenskurven der Behandlungsgruppen sehr eng beieinander lagen und sich nicht offensichtlich voneinander unterscheiden. Ein Trend ließ sich nicht ausmachen. Zur statistischen Analyse wurde ein Log-Rank-Test benutzt, der keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigte ( $\chi^2_{(3)} = 1,579; p = .664$ ), sodass von weiteren paarweisen Vergleichen abgesehen wurde.

Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass sich die Behandlungsgruppen im Überleben nicht von der Kontrollgruppe unterscheiden.



**Abbildung 9: Kaplan – Meier – Diagramm für das Überleben der Behandlungsgruppen**

H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe; Ril30: 30 mg Riluzol/kg; Fas30: 30 mg Fasudil/kg; FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (jeweils n = 14).

### 3.2. Klinisch funktionelle und kognitive Tests

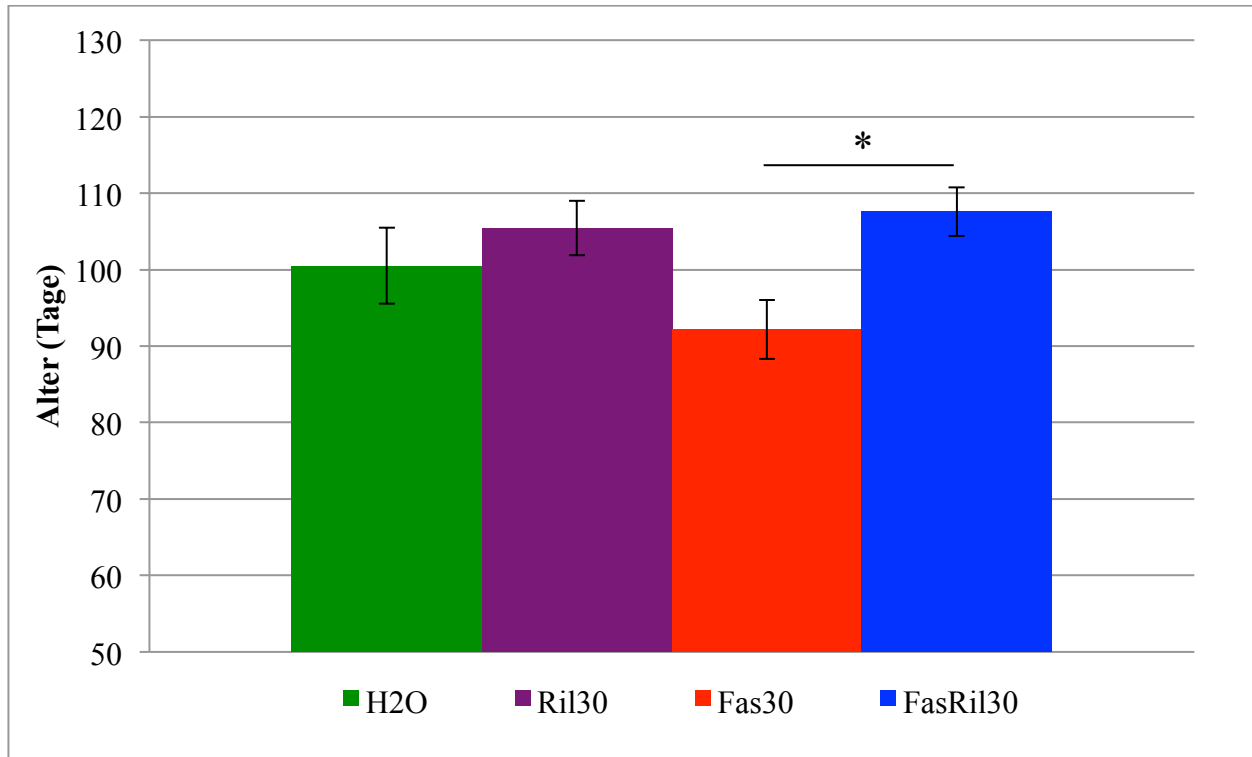
#### 3.2.1. Klinischer Score

##### 3.2.1.1. Krankheitsbeginn

Der Krankheitsbeginn wurde, wie im Methodenteil beschrieben, bei klinischer Untersuchung der Mäuse per Inspektion festgestellt. Der Tag, an dem die ersten Symptome auftraten, wurde als Krankheitsbeginn gewertet. Im Mittel lag dieser in der Ril30-Gruppe an Tag 105 (SEM = 4,95), in der H<sub>2</sub>O-Gruppe an Tag 101 (SEM = 3,55), in der Fas30-Gruppe an Tag 92 (SEM = 3,85) und in der FasRil30-Gruppe an Tag 108 (SEM = 3,17) (vgl. Abbildung 10).

In einer univariaten Varianzanalyse zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Intersubjektfaktors „Gruppe“ auf die Variable „Tag des Krankheitsbeginns“ ( $F_{(3)} = 3,033$ ;  $p = .037$ ;  $\eta^2 = .149$ ). Eine weitere Aufschlüsselung durch einen Post-Hoc-Tukey-Test ergab zwar einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen Fas30 und FasRil30 ( $p = .037$ ), aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe.

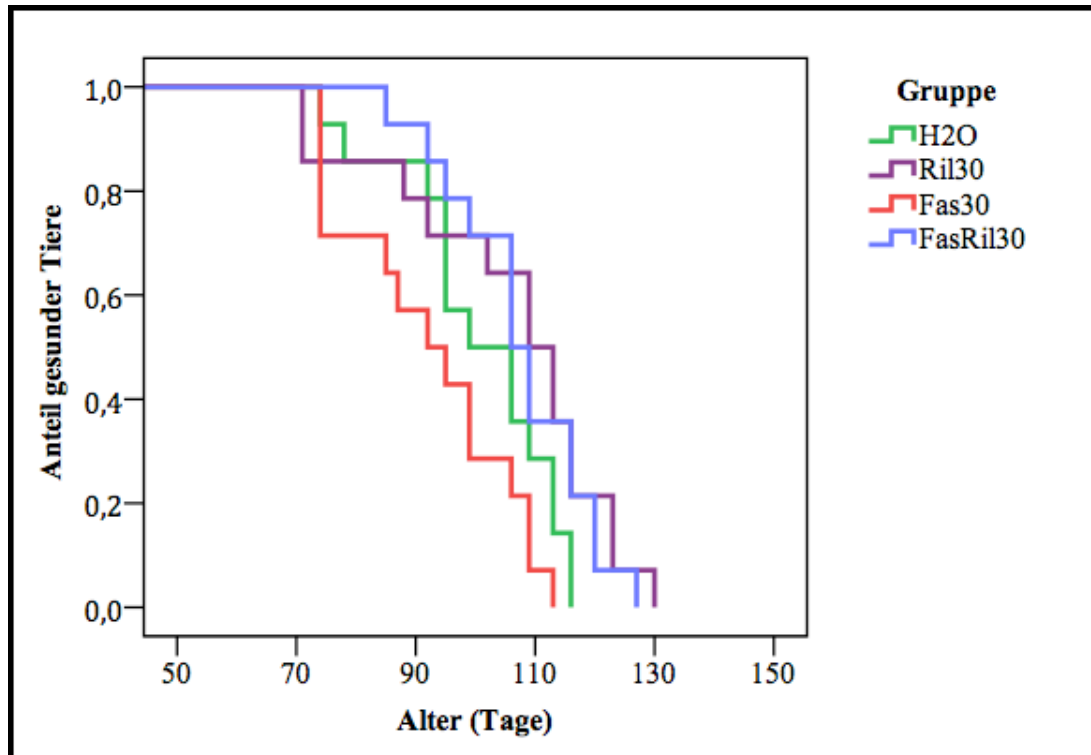




**Abbildung 10: Darstellung des mittleren klinischen Krankheitsbeginns**

H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe; Ril30: 30 mg Riluzol/kg; Fas30: 30 mg Fasudil/kg; FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (jeweils n=14). Angegeben sind Mittelwerte +/- Standardfehler; \* = p<0.05. Der Krankheitsbeginn entsprach einem erstmaligem klinischen Score von 3.

Zur weiteren Analyse wurden die Daten in einem Diagramm nach Kaplan-Meier aufgetragen. Es fällt auf, dass die Kurve der Fas30-Gruppe ab Tag 75 unter den Kurven der anderen Gruppen liegt, wobei die Kurven der Ril30- und Kombinationsbehandlungsgruppe über den anderen Kurven liegen. Zur statistischen Analyse wurde ein Mann-Whitney-U-Test gerechnet, der einen generellen signifikanten Gruppenunterschied feststellen konnte ( $\chi^2_{(3)} = 9,245$ ;  $p = .026$ ), spezifisch aufgeschlüsselt ergaben sich signifikante Unterschied von Fas30 gegenüber Ril30 ( $\chi^2_{(3)} = 4,574$ ;  $p = .032$ ) sowie gegenüber FasRil30 ( $\chi^2_{(3)} = 6,740$ ;  $p = .008$ ). Keine Gruppe unterschied sich signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 11).



**Abbildung 11: Kaplan – Meier – Diagramm zur Darstellung des klinischen Krankheitsbeginns**

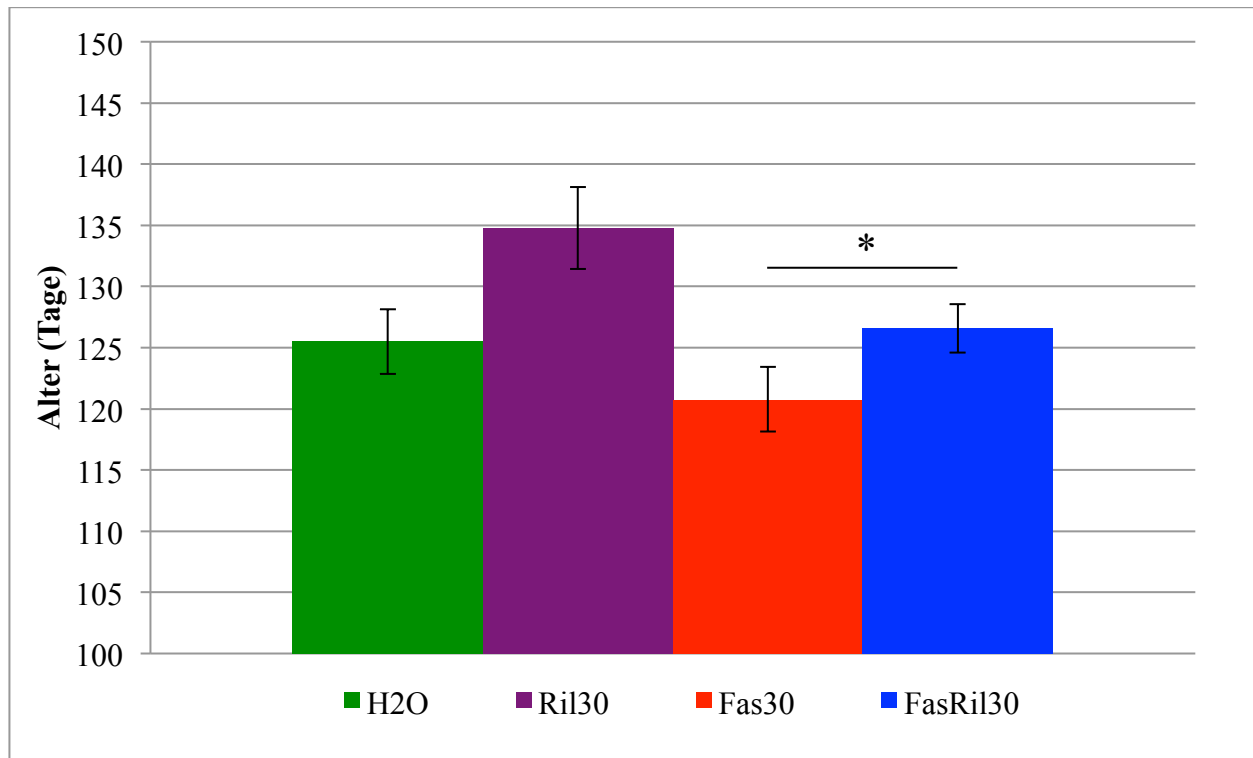
H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe; Ril30: 30 mg Riluzol/kg; Fas30: 30 mg Fasudil/kg; FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (jeweils n=14). Das Diagramm zeigt den kumulativen Anteil der gesunden Tiere je Versuchsgruppe (n=14) im zeitlichen Verlauf des Experiments.

### 3.2.1.2. Beginn der schweren Krankheit

Auch der Beginn der schweren Krankheit wurde durch klinische Untersuchung der Mäuse per Inspektion wie bereits beschrieben festgestellt. Im Mittel lag dieser für die H<sub>2</sub>O-Gruppe an Tag 126 (SEM = 2,66), die Ril30-Gruppe an Tag 135 (SEM = 3,35), für die Fas30-Gruppe an Tag 121 (SEM = 2,64) und für die FasRil30-Gruppe an Tag 127 (SEM = 1,97) (vgl. Abbildung 12). Dabei fällt zunächst auf, dass der Wert für die Ril30-Gruppe deutlich höher liegt als die Werte der anderen zwei Behandlungsgruppen, jedoch mit 3,35 Tagen auch den größten Standardfehler hat (H<sub>2</sub>O: SEM = 2,66; Fas30: SEM = 2,64; FasRil30: SEM = 1,97). Der für den Krankheitsbeginn noch erkennbare Unterschied der Gruppen Fas30 und FasRil30 ist nun deutlich kleiner.

Die statistische Analyse durch eine univariate ANOVA zeigte einen signifikanten Einfluss des Intersubjektfaktors „Gruppe“ auf die Variable „Beginn der schweren Krankheit“ ( $F_{(3)} = 4,642$ ;  $p = .006$   $\eta^2 = .211$ ). Durch die post-hoc durchgeführten Tukey-Tests konnte zwar ein signifikanter

Unterschied zwischen den Gruppen Ril30 und Fas30 ( $p = .003$ ), jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe nachweisen werden.



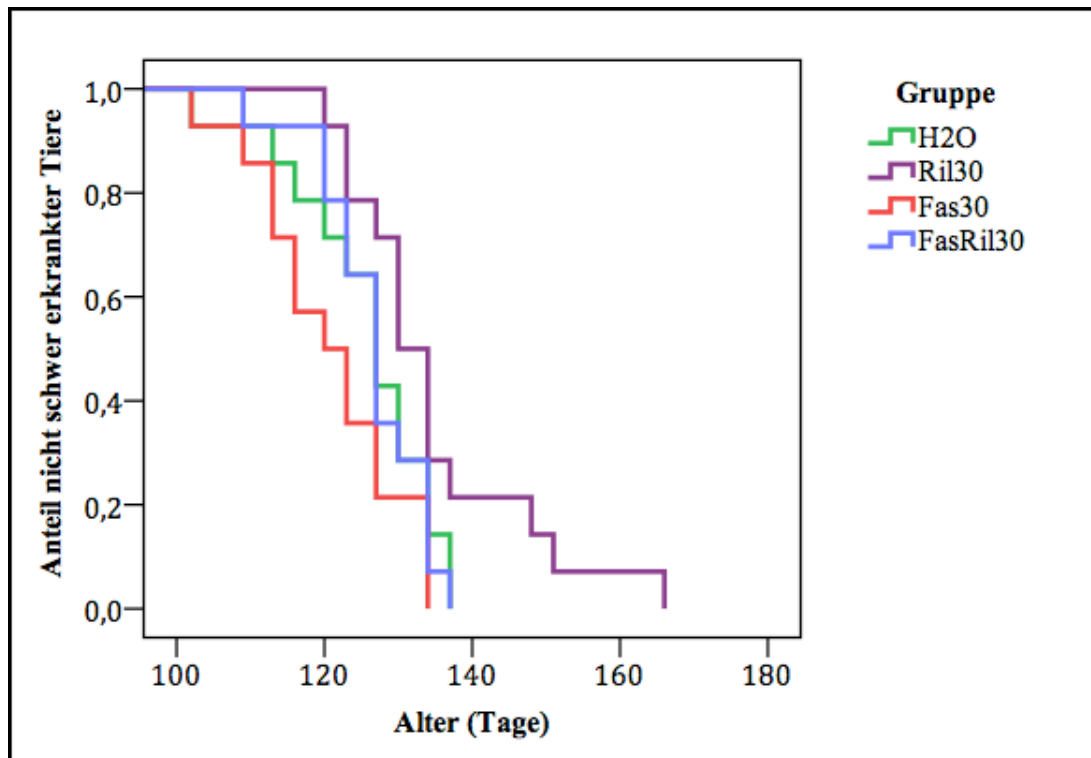
**Abbildung 12: Darstellung des mittleren Beginns der schweren Krankheit**

H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe; Ril30: 30 mg Riluzol/kg; Fas30: 30 mg Fasudil/kg; FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (jeweils n=14). Die Grafik zeigt den mittleren Beginn der schweren Krankheit pro Gruppe, welcher einem klinischen Score von 2 entspricht. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. \* =  $p < 0.05$ .

Die Daten wurden nach der Auswertung der Mittelwerte zur besseren Übersicht in einem Diagramm nach Kaplan-Meier aufgetragen. Es fällt auf, dass die Kurve der Fas30-Gruppe ab Tag 110 unter den Kurven der anderen Gruppen liegt, wobei anders als bei der Auswertung des Krankheitsbeginns die Ril30 Kurve mit Ausnahme von einzelnen Berührungspunkten mit der FasRil30 Kurve kontinuierlich über den anderen Kurven liegt. Die anderen Gruppen schneiden die x-Achse ungefähr ab Tag 135; somit sind alle Tiere schwer erkrankt. Zu diesem Zeitpunkt sind noch vier Tiere aus der Ril30-Gruppe nicht schwer erkrankt.

Zur statistischen Analyse wurde ein Mann-Whitney-U-Test gerechnet, der einen generellen signifikanten Gruppenunterschied feststellen konnte ( $\chi^2_{(3)} = 9,836$ ;  $p = .020$ ), spezifisch aufgeschlüsselt ergab sich ein signifikanter Unterschied von Fas30 gegenüber Ril30 ( $\chi^2_{(1)} = 8,446$ ;  $p = .004$ ), sowie ein Trend für einen Unterschied zwischen FasRil30 und Ril30 ( $\chi^2_{(1)} =$

3,065;  $p = .080$ ). Keine Gruppe unterschied sich signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 13).



**Abbildung 13: Darstellung des kumulativen Anteils der nicht schwerkranken Tiere je Versuchsgruppe im zeitlichen Verlauf des Experiments**

H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe; Ril30: 30 mg Riluzol/kg; Fas30: 30 mg Fasudil/kg; FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (jeweils n=14).

### 3.3. Drehwalzentest Rotarod

Bei der deskriptiven Betrachtung der Daten fällt zunächst auf, dass für alle Behandlungsgruppen sowie für die Wildtypen bis zum Tag 74 die verbrachte Zeit auf dem Rotarod im Mittel konstant über 230 Sekunden lag, nachdem sie von Tag 50 auf Tag 53 zunächst leicht angestiegen war. Im Verlauf des Experiments wurde von keiner Gruppe der Maximalwert von im Mittel 300 Sekunden erreicht. Die Wildtypen zeigten während des gesamten Versuches konstante Laufleistungen von über 260 Sekunden. Im Gegensatz dazu verschlechterten sich die Gruppen Ril30 und Fas30 ab Tag 85, die Gruppe FasRil30 ab Tag 102 und die Gruppe H<sub>2</sub>O ab Tag 106 kontinuierlich bis zum Ende des Experiments. Es ist auffällig, dass die Gruppe H<sub>2</sub>O dabei die Gruppe war, die am längsten konstante Werte zeigte. Der Abfall der Kurven war nach den genannten Tagen sehr steil, sodass bereits an Tag 134 keine Gruppe mehr über eine Laufleistung

von im Mittel 50 Sekunden kam (vgl. Abbildung 14), wobei die Grenze von im Mittel 150 Sekunden zunächst von der Fas30-Gruppe an Tag 116 mit einem Mittelwert von 118,48 Sekunden unterschritten wurde. An Tag 120 folgte die Gruppe Ril30 mit einem Mittelwert von 149,30 Sekunden und an Tag 123 die Gruppe H<sub>2</sub>O sowie die Gruppe FasRil30 mit einem Mittelwert von 146,10 bzw. 117,02. Ab Tag 112 ist dabei jedoch zu beachten, dass bis zum Ende kontinuierlich mehr Tiere aus dem Experiment ausschieden, da sie einen klinischen Score von Null erreichten. Der letzte Tag mit jeweils 14 Tieren pro Behandlungsgruppe war Tag 109.

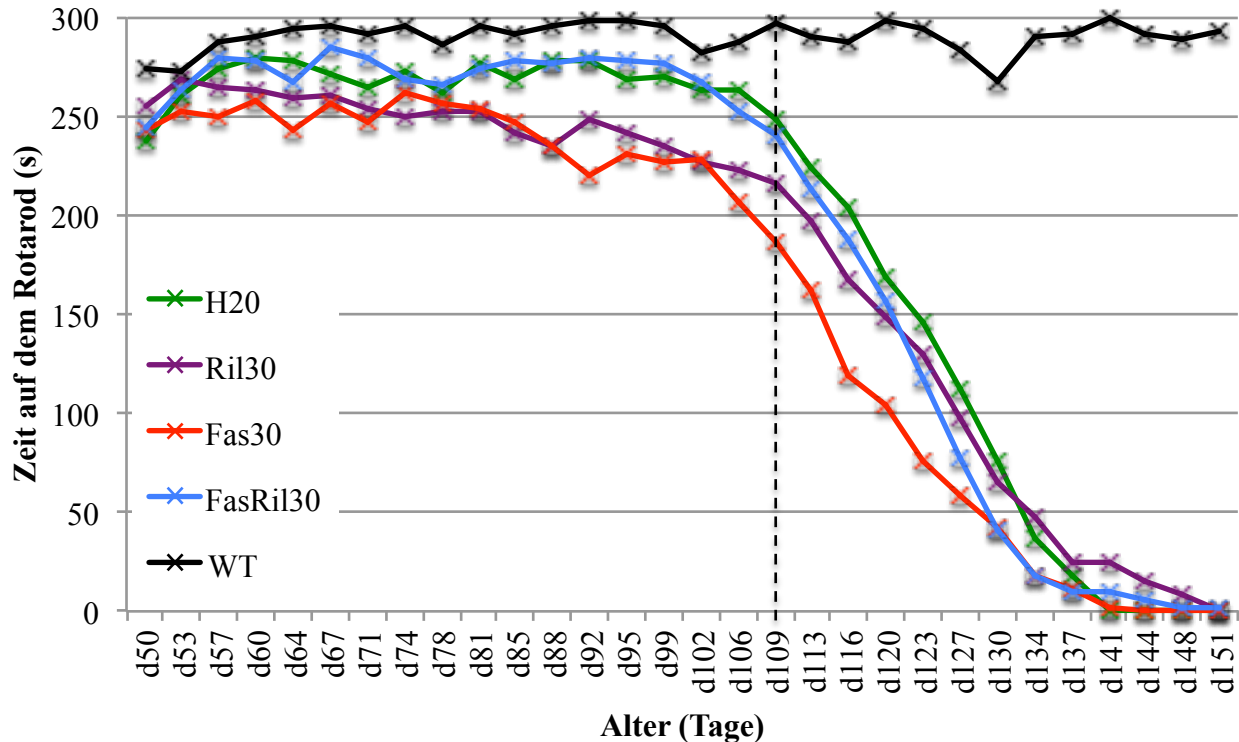
Versuchstag	H <sub>2</sub> O	Ril30	Fas30	FasRil30	WT
d50	237,71	254,98	243,43	244,31	273,53
d53	259,98	267,93	252,79	263,33	272,80
d57	274,26	265,14	249,26	279,64	287,27
d60	279,50	262,60	258,02	277,64	290,53
d64	278,33	259,02	242,57	267,74	294,13
d67	270,69	260,17	255,90	285,07	295,40
d71	265,00	253,81	247,43	279,38	292,13
d74	272,76	249,43	261,95	268,64	295,47
d78	262,40	252,21	256,10	265,93	285,73
d81	277,26	252,50	253,79	273,38	295,13
d85	269,00	241,10	247,21	277,50	291,07
d88	277,55	235,33	234,36	276,12	295,87
d92	278,17	248,07	220,24	279,67	298,80
d95	268,98	241,60	230,21	278,05	297,53
d99	269,29	234,64	227,33	277,00	295,00
d102	263,19	226,98	227,95	266,57	282,47
d106	263,67	222,60	206,29	252,48	287,27
d109	248,24	216,45	186,07	240,19	297,07
d113	224,40	197,76	161,81	213,17	290,07
d116	203,36	166,93	118,48	187,26	287,47
d120	168,57	149,31	104,21	156,55	297,60
d123	146,10	129,38	75,60	117,02	294,07
d127	111,69	97,14	57,81	77,33	283,13
d130	75,29	65,31	42,38	41,38	267,67
d134	37,19	47,17	18,40	18,38	290,20
d137	18,10	24,24	11,86	9,67	291,93
d141	0,00	24,49	1,62	9,42	299,00
d144	0,00	15,79	0,00	5,76	291,80
d148	0,00	8,77	0,00	2,18	288,80
d151	0,00	0,00	0,00	1,70	292,60

**Tabelle 3: Mittelwerte der Zeit auf dem Rotarod (s) der Versuchsgruppen an den entsprechenden Versuchstagen**

Für die statistische Analyse der Daten wurden zur exakteren Vergleichbarkeit der Gruppen nur die Tage herangezogen, an denen in den Behandlungsgruppen noch jeweils alle 14 Tiere vorhanden waren. An Lebenstag 119 wurde die erste Maus der FasRil30-Gruppe nach dem Erreichen eines klinischen Punktwerts von Null eingeschläfert. In die statistische Berechnung wurde daher der Zeitraum zwischen Tag 50-109, was 18 Testtagen entsprach, einbezogen (vgl. vertikale Linie in Abbildung 14). Für diese Testtage wurde eine ANOVA mit Messwiederholung gerechnet. Diese konnte zwar einen signifikanten Einfluss des Innersubjektfaktors „Zeit“ auf die Variable „Zeit auf dem Rotarod“ ( $F_{(4,321)} = 4,735; p = .001; \eta^2 = .078$ ), jedoch keine Interaktion der Gruppenzugehörigkeit mit dem Faktor „Zeit“ ( $F_{(17,309)} = 1.341; p = .166; \eta^2 = .087$ ) nachweisen.

Zur genaueren Betrachtung der Behandlungsgruppen wurden deshalb die Wildtypen aus der weiteren statistischen Berechnung ausgeschlossen. Es wurde erneut eine ANOVA mit Messwiederholung gerechnet. Auch in dieser Analyse zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Innersubjektfaktors „Zeit“ auf die Variable „Zeit auf dem Rotarod“ ( $F_{(4,281)} = 7,263; p < .001; \eta^2 = .123$ ). Eine Interaktion der Gruppenzugehörigkeit mit dem Faktor „Zeit“ konnte jedoch über einen Trend hinaus nicht gezeigt ( $F_{(12,843)} = 1,430; p = .148; \eta^2 = .076$ ) und somit ein Einfluss der Behandlung auf die Laufleistung nicht bewiesen werden.

Zusammenfassend finden sich daher in diesem Test keine Unterschiede bezüglich der getesteten Variablen zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe.



**Abbildung 14: Mittlere Zeit auf dem Rotarod pro Versuchsgruppe und Testtag**

H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe; Ril30: 30 mg Riluzol/kg; Fas30: 30 mg Fasudil/kg; FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg. Statistische Berechnungen wurden bis Tag 109 (gestrichelte Linie) durchgeführt; durch das Versterben beruhen die Mittelwerte im weiteren Verlauf auf kontinuierlich weniger Tieren.

### 3.4. Ganganalyse Test „Catwalk“

#### 3.4.1. Mittlere Dauer eines Versuchsdurchlaufs „run duration“

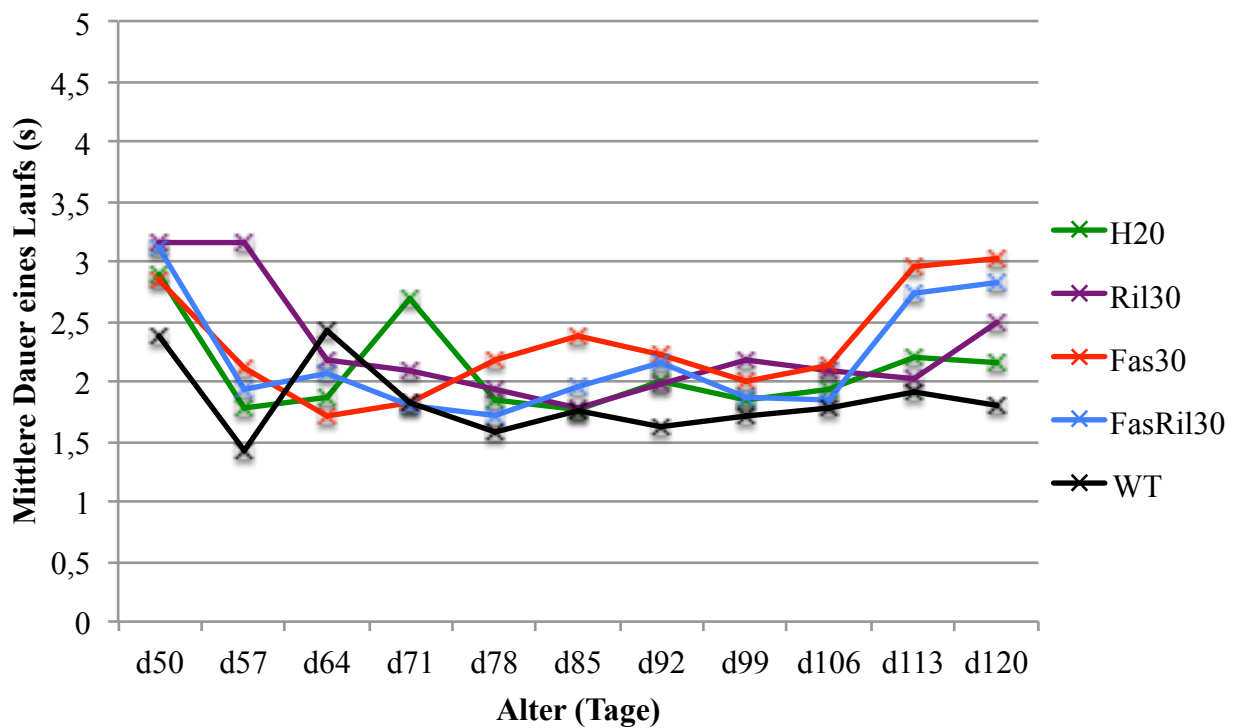
Die mittlere Dauer eines Versuchsdurchlaufs ergab sich als Mittelwert der drei einzelnen Läufe pro Maus an jedem Versuchstag. In Abbildung 15 wurden die Mittelwerte der Gruppen pro Versuchstag aufgetragen. Es wird dadurch deutlich, dass die Tiere ab Tag 64 eine kontinuierliche Laufzeit zwischen 1,5 und 2,5 Sekunden benötigten. Ab Tag 103 stiegen die Laufzeiten vor allem in der Fas30-Gruppe und der FasRil30-Gruppe an. Die Wildtypen benötigten ab Tag 71 bis zum Ende des Versuchs die kürzesten Zeiten. Insgesamt lässt sich jedoch eine große Standardabweichung finden (vgl. Tabelle 4).

Es lagen insgesamt 52 vollständige Datensätze vor; aufgeschlüsselt nach Versuchsgruppe: Ril30 n=13, H<sub>2</sub>O n=12, Fas30 n=10, FasRil30 n=13 und WT n=4. In der statistischen Analyse durch eine ANOVA mit Messwiederholung zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Innersubjektfaktors „Zeit“ auf die Variable „Laufdauer“ ( $F_{(6,733)} = 5,267$ ;  $p < .001$ ;  $\eta^2 = .092$ ). Ein

eine Interaktion der Variablen, also ein Einfluss der Gruppenzugehörigkeit auf das Testergebnis, konnte nicht nachgewiesen werden ( $F_{(26,964)} = .978$ ;  $p = .499$ ;  $\eta^2 = .077$ ).

Nach Ausschluss der Wildtypen zeigte sich erneut eine Veränderung der Laufdauer über die Zeit ( $F_{(6,663)} = 6,811$ ;  $p < .001$ ;  $\eta^2 = .134$ ) und kein Einfluss der Behandlung auf die Laufdauer ( $F_{(19,990)} = 1,048$ ;  $p = .406$ ;  $\eta^2 = .067$ ).

Es zeigte sich demnach ein allgemeiner Unterschied der Laufdauer über den Versuchszeitraum, jedoch zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe bzw. kein Unterschied zwischen Wildtypen und transgenen Tieren.



**Abbildung 15: Mittlere Laufdauer der Mäuse nach Behandlungsgruppen an den Testtagen**

H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe (n=12); Ril30: 30 mg Riluzol/kg (n=13); Fas30: 30 mg Fasudil/kg (n=10); FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (n=13); WT: Gesunde Wildtypen (n=4).



Versuchstag	H <sub>2</sub> O	Ril30	Fas30	FasRil30	WT
d50	1,22	3,15	1,34	1,70	0,70
d57	0,48	3,19	1,26	0,61	0,19
d64	0,62	0,80	0,53	0,77	0,67
d71	1,88	0,69	0,67	0,47	0,78
d78	0,79	0,76	0,54	0,49	0,44
d85	0,54	0,59	1,20	0,66	0,50
d92	0,94	0,78	0,79	0,88	0,59
d99	1,21	1,40	0,75	0,63	0,32
d106	0,74	1,26	0,84	0,82	0,42
d113	1,10	0,70	1,70	2,52	1,67
d120	0,92	0,99	1,24	0,88	0,42

**Tabelle 4: Standardabweichungen der Gruppen für die Mittlere Laufdauer (s) pro Testtag**

### 3.4.2. Schrittlänge „*stride length*“

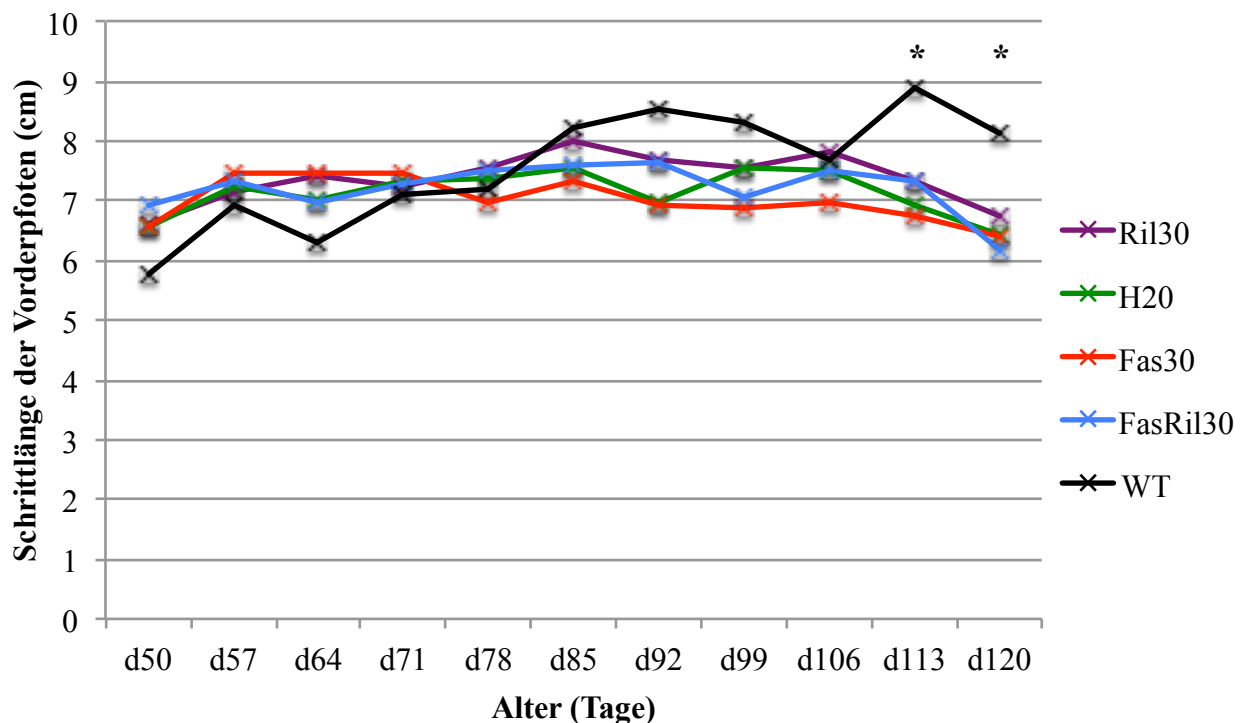
Die Schrittlänge der Vorderbeine entsprach dem Abstand von der Spitze eines Pfotenabdrucks bis zur Spitze des Abdrucks derselben Pfote nach dem nächsten Schritt. Betrachtet wurden die für die Testtage über die Versuchsgruppen gemittelten Werte der oberen Extremität.

Es lagen insgesamt 45 vollständige Datensätze vor; aufgeschlüsselt nach Versuchsgruppe: Ril30 n=9, H<sub>2</sub>O n=11, Fas30 n=9, FasRil30 n=12 und WT n=4. Bei der Betrachtung von Abbildung 16 fällt zunächst auf, dass alle Gruppen eine ähnliche Schrittlänge aufwiesen, welche sich über den Zeitraum des Experiments nicht dramatisch veränderte. Die Werte lagen für die SOD-G93A-Tiere von Tag 50 bis 113 im Bereich zwischen 6 und 8 cm, wobei die Werte zunächst leicht ansteigen und ab ungefähr Tag 85 bis zum Ende leicht abfielen. Die Wildtypgruppe zeigte einen kontinuierlichen Anstieg von ca. 6 cm bis über 8 cm.

Durch eine ANOVA mit Messwiederholung ließ sich dieser Eindruck durch einen signifikanten Einfluss des Faktors „Zeit“ auf die Variable „Schrittlänge“ bestätigen ( $F_{(6,545)} = 10,916$ ;  $p < .001$ ;  $\eta^2 = .214$ ). Auch eine Interaktion der Behandlungsgruppe mit dem Testtag hinsichtlich der Variable „Schrittlänge“ konnte nachgewiesen werden ( $F_{(26,179)} = 2,181$ ;  $p = .001$ ;  $\eta^2 = .179$ ). Da dieser deskriptiv durch die hohen Werte der Wildtypen gegen Ende des Versuchs erklärbar scheint (d113 und d120), wurde an diesen Tagen eine univariate ANOVA gerechnet. Diese deckte zunächst einen signifikanten Gruppenunterschied auf ( $F_{(4)} = 5,339$ ;  $p = .001$ ;  $\eta^2 = .287$ ), welcher durch einen post-hoc Tukey-Test den Unterschied der Wildtypen zu allen anderen Gruppen an diesen Tagen bestätigte.

Nach Ausschluss der Wildtypen zur Überprüfung des Behandlungseinflusses zeigte sich erneut ein Einfluss des Faktors „Zeit“ auf die Variable „Schrittlänge“ ( $F_{(6,475)} = 9,618; p < .001; \eta^2 = .206$ ), jedoch keine Interaktion der Variablen „Gruppe“ und „Zeit“ ( $F_{(19,424)} = 1,012; p = .382; \eta^2 = .080$ ).

Zusammengefasst zeigt sich im Versuchsverlauf ein genereller Unterschied der Schrittlänge. Außerdem findet sich ein Unterschied der Wildtypen gegenüber den transgenen Tieren am Ende des Versuchszeitraums. Ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe lässt sich nicht feststellen.



**Abbildung 16: Mittlere Schrittlänge der Vorderpfoten pro Gruppe und Versuchstag**

H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe (n=12); Ril30: 30 mg Riluzol/kg (n=9); Fas30: 30 mg Fasudil/kg (n=9); FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (n=11); WT: Gesunde Wildtypen (n=4); \* = p<0.05.

### 3.4.3. Fläche des Pfotenabdrucks „print area“

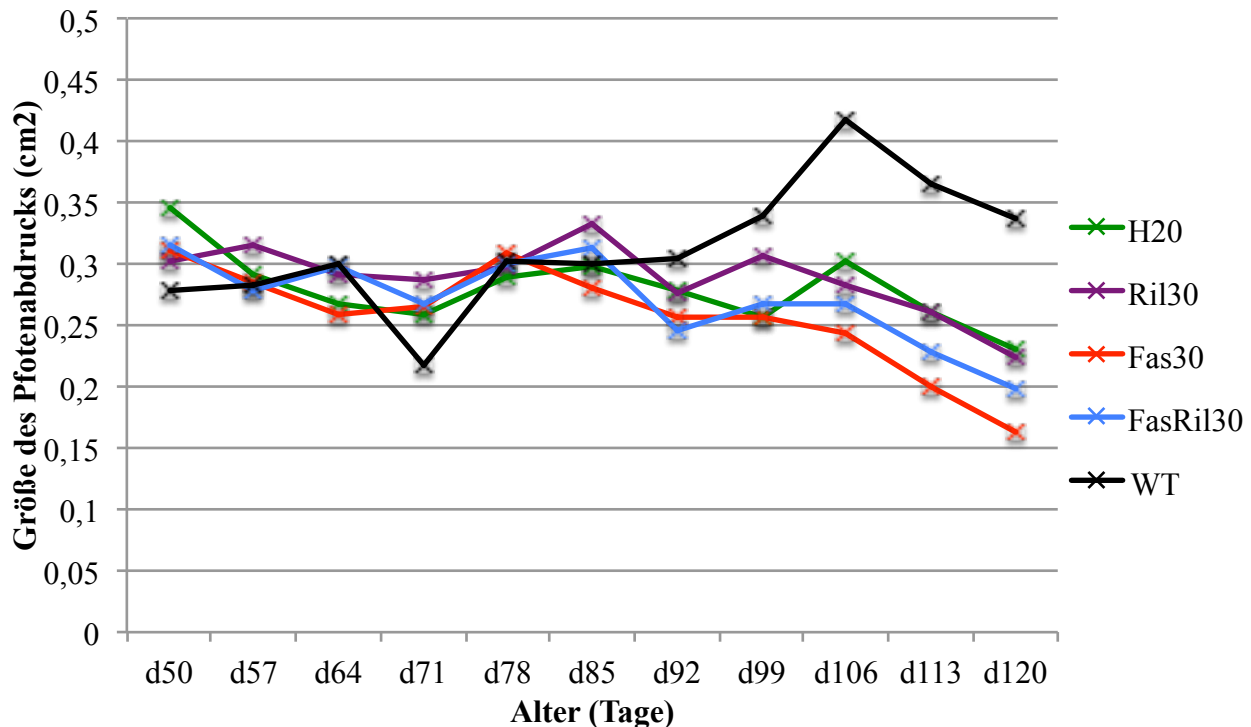
Wie anhand von Abbildung 17 deutlich wird, zeigte sich die Fläche des Pfotenabdrucks der Hinterfüße durch alle Gruppen hinweg an den Tagen 50 bis 92 relativ konstant bei Werten um 0,3 cm<sup>2</sup>. Im weiteren Verlauf des Experiments nahm die Fläche bei den Wildtypentieren bis auf einen Wert von 0,35 cm<sup>2</sup> kontinuierlich leicht zu. Bei allen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe nahm die Fläche kontinuierlich ab, wobei dies bei der Fas30-Gruppe, gefolgt von der FasRil30-

Gruppe, am stärksten der Fall war. Die Ril30-Gruppe unterschied sich deskriptiv kaum von der H<sub>2</sub>O-Gruppe.

Es lagen insgesamt 45 vollständige Datensätze vor; aufgeschlüsselt nach Versuchsgruppe (Ril30 n=9, H<sub>2</sub>O n=11, Fas30 n=9, FasRil30 n=12 und WT n=4). Zur statistischen Auswertung wurde eine ANOVA mit Messwiederholung verwendet, welche einen signifikanten Einfluss des Innersubjektfaktors „Zeit“ auf die Variable „Fläche des Pfotenabdrucks“ ( $F_{(5-211)} = 6,254$ ;  $p < .001$ ;  $\eta^2 = .135$ ) zeigte. Eine Interaktion der Variablen „Zeit“ und „Gruppe“ konnte allenfalls als Trend gezeigt werden ( $F_{(20.843)} = 1,362$ ;  $p = .141$ ;  $\eta^2 = .120$ ). Deskriptiv ist dieser Gruppeneinfluss durch die Wildtypgruppe zu erklären, die als einzige Gruppe konstante Werte aufwies.

In einer Analyse der Versuchstiere ohne Wildtyptiere zeigte sich erneut eine signifikante Änderung der „Fläche des Pfotenabdrucks“ über den Versuchsverlauf ( $F_{(5.123)} = 8,544$ ;  $p < .001$ ;  $\eta^2 = .188$ ) jedoch im Mittel der Tage – wie erwartet – kein signifikanter Einfluss der Gruppe auf die Variable „Fläche des Pfotenabdrucks“ ( $F_{(15.368)} = 0,661$ ;  $p = .824$ ;  $\eta^2 = .051$ ).

Zusammengefasst ergab sich somit sowohl eine Veränderung der Fläche des Pfotenabdrucks über den Zeitraum des Experiments als auch ein Trend zu Unterschieden der Wildtypen zu den transgenen Tieren gegen Ende des Versuchszeitraums. Es ließ sich allerdings kein signifikanter Unterschied der Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe im Verlauf feststellen.



**Abbildung 17: Mittlere Fläche der Hinterfuß-Pfotenabdrücke pro Gruppe und Versuchstag**

H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe (n=11); Ril30: 30 mg Riluzol/kg (n=9); Fas30: 30 mg Fasudil/kg (n=9); FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (n=12); WT: Gesunde Wildtypen (n=4).

#### 3.4.4. Schrittgeschwindigkeit „swing speed“

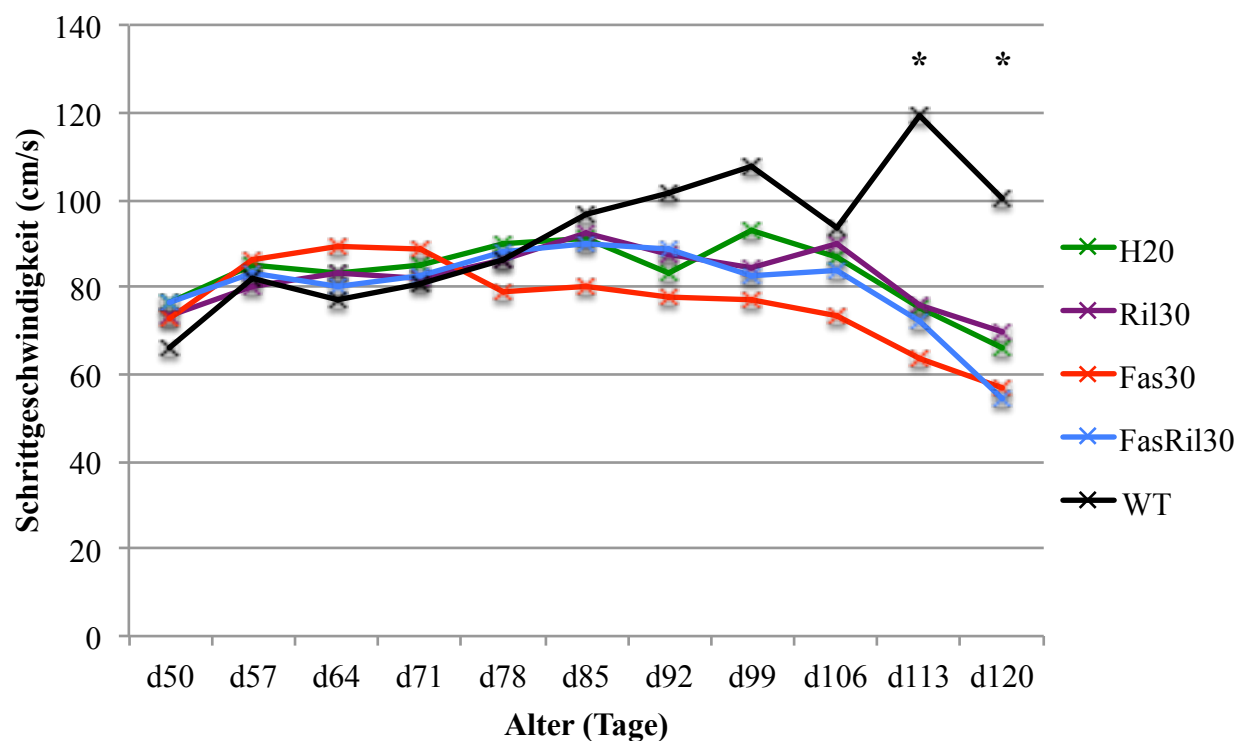
Die Schrittgeschwindigkeit ist, wie im Methodenteil beschrieben, die Schnelligkeit der Extremitätenbewegungen der Mäuse während des Laufens, welche in Zentimeter pro Sekunde angegeben wird. Anhand von Abbildung 18 wird deutlich, dass diese am Anfang des Experimentalzeitraums zunächst leicht anstieg, und danach für einen Zeitraum von acht Wochen ungefähr 80 cm/s betrug. Gegen Ende des Experiments fiel sie bei den SOD-G93A-Tieren ab Tag 106 ab. Ab Tag 85 wies die Fas30 Gruppe konstant geringere Mittelwerte als die anderen Versuchsgruppen auf. Die gesunden Wildtypiere erreichten ab Tag 85 höhere Mittelwerte als die restlichen Versuchsgruppen.

Es lagen insgesamt 47 vollständige Datensätze vor (Ril30 n=10, H<sub>2</sub>O n=11, Fas30 n=9, FasRil30 n=13 und WT n=4). Die statistische Auswertung erfolgte durch eine ANOVA mit Messwiederholung. Es zeigte sich ein genereller, statistisch signifikanter Einfluss des Innersubjektfaktors „Zeit“ auf die Variable „Schrittgeschwindigkeit“ ( $F_{(6,932)} = 10,070$ ;  $p < .001$ ;  $\eta^2 = .193$ ). Auch eine Interaktion der Gruppen mit der zeitlichen Komponente konnte gezeigt werden ( $F_{(27,729)} = 2,002$ ;  $p = .003$ ;  $\eta^2 = .160$ ). Anhand von Abbildung 18 lässt sich erneut

vermuten, dass diese vor allem durch die generell hohen Werte der Wildtypen gegen Ende des Experiments erklärt werden kann. Dies bestätigte sich für Tag 113 in einer univariaten ANOVA mit post-hoc Tests ( $F_{(4)} = 6,772$ ;  $p < .001$ ;  $\eta^2 = .388$ ; WT sig. Ril30/H<sub>2</sub>O/Fas30/FasRil30  $p < .001$ ) sowie für Tag 120 ( $F_{(4)} = 5.530$ ;  $p = .001$ ;  $\eta^2 = .320$ ; WT sig. Ril30  $p = .040$ ; H<sub>2</sub>O  $p = .015$ ; Fas30  $p = .002$ ; FasRil30  $p = .001$ ).

In einer weiteren statistischen Analyse der Versuchsgruppen ohne Wildtypiere zeigte sich zwar eine signifikante Veränderung der „Schrittgeschwindigkeit“ im Zeitverlauf ( $F_{(6,728)} = 13,272$ ;  $p < .001$ ;  $\eta^2 = .254$ ), allerdings wie erwartet kein signifikanter Einfluss der Gruppenzugehörigkeit in Verbindung mit der Zeit auf die Variable „Schrittgeschwindigkeit“ ( $F_{(20,185)} = 1,027$ ;  $p = .431$ ;  $\eta^2 = .073$ ).

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die Schrittgeschwindigkeit in den Gruppen mit SOD-G93A-Tieren zum Ende des Experiments signifikant sinkt und ab Tag 113 Unterschiede der transgenen Tiere zu den Wildtypen vorhanden sind. Keine Unterschiede zeigen sich zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe.



**Abbildung 18: Mittlere Schrittgeschwindigkeit pro Gruppe und Versuchstag**

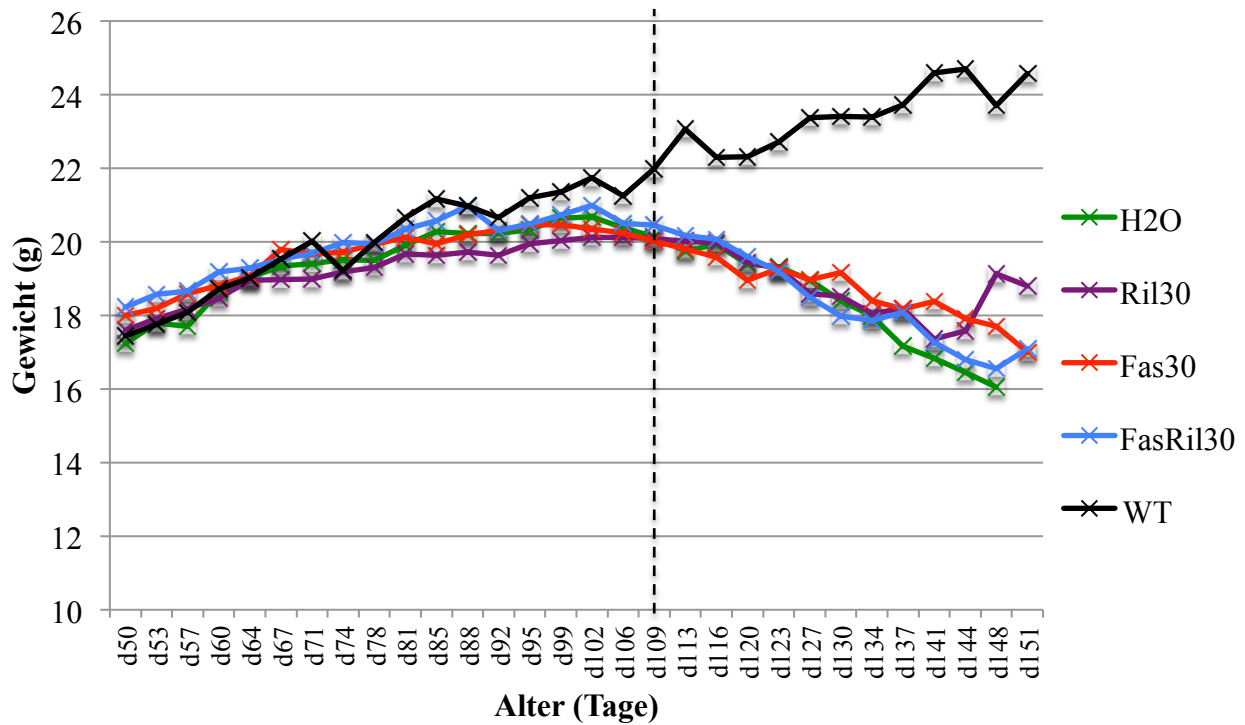
H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe (n=11); Ril30: 30 mg Riluzol/kg (n=10); Fas30: 30 mg Fasudil/kg (n=9); FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (n=13); WT: Gesunde Wildtypen (n=4); \* =  $p < 0.05$

### 3.5. Körpergewicht

Auffallend bei der Betrachtung der Daten zum Körpergewicht der Mäuse ist, dass zunächst ein sehr homogener Anstieg des Gewichts über alle Gruppen vorliegt und ca. ab Tag 81 die Mittelwerte der Gruppen bis zum Ende des Versuchs alle um 20 Gramm liegen. Deskriptiv lassen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen Behandlungs- und Testgruppen feststellen (vgl. Abbildung 19). Auch zeigen die SOD-G93A-Gruppen zunächst keinen Unterschied zur Gruppe der Wildtypen. Ab Tag 81 sind die Wildtypen ca. ein Gramm schwerer als die SOD-G93A-Mäuse. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse zusammengefasst, wobei nur die Versuchstage bis inklusive Tag 109 dargestellt sind, da ab diesem Zeitpunkt die ersten Tiere verstarben und die Mittelwerte somit kontinuierlich in ihrer Aussagekraft verlieren. Zusätzlich zu dem beschriebenen Zeitraum sind die Ergebnisse der Tage 109-148 in Tabelle 6 zusammengefasst. Es lässt sich in diesen Tagen eine generelle Gewichtsabnahme um ca. 2 Gramm, also 10% des Maximalgewichts, feststellen.

Bei der statistischen Analyse der Daten im Zeitraum Tag 50-109 durch eine ANOVA mit Messwiederholung zeigte sich nur ein signifikanter Einfluss des Innersubjektfaktors „Zeit“ auf die Variable „Gewicht“ ( $F_{(5,932)} = 104,469$ ;  $p < .001$ ;  $\eta^2 = .668$ ); eine Interaktion der beiden Faktoren konnte nicht gezeigt werden ( $F_{(17,795)} = 1,463$ ;  $p = .223$ ;  $\eta^2 = .067$ ).

Somit konnte zwar ein hochsignifikanter Gewichtsanstieg über die Zeit, jedoch bezüglich des Körpergewichts kein Unterschied der Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe und kein Unterschied der transgenen Tiere im Vergleich mit den Wildtypen gezeigt werden.



**Abbildung 19: Darstellung des Körpergewichts (g) der Versuchstiere über die Testtage**

H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe (n=14); Ril30: 30 mg Riluzol/kg (n=14); Fas30: 30 mg Fasudil/kg (n=14); FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (n=14); WT: Gesunde Wildtypen (n=5). Statistische Berechnungen wurden bis Tag 109 (gestrichelte Linie) durchgeführt; durch das Versterben beruhen die Mittelwerte im weiteren Verlauf auf kontinuierlich weniger Tieren.

	<b>Ril30</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Fas30</b>	<b>FasRil30</b>	<b>WT</b>
<b>d50</b>	17,60	17,24	18,00	18,23	17,44
<b>d53</b>	17,92	17,80	18,18	18,57	17,76
<b>d57</b>	18,17	17,71	18,59	18,66	18,08
<b>d60</b>	18,47	18,64	18,82	19,19	18,72
<b>d64</b>	18,96	19,02	19,08	19,29	19,02
<b>d67</b>	18,97	19,34	19,80	19,54	19,54
<b>d71</b>	19,00	19,41	19,67	19,69	20,02
<b>d74</b>	19,19	19,51	19,72	19,99	19,22
<b>d78</b>	19,31	19,50	19,94	19,95	19,98
<b>d81</b>	19,67	19,91	20,12	20,35	20,66
<b>d85</b>	19,64	20,29	19,95	20,57	21,16
<b>d88</b>	19,72	20,23	20,20	20,98	20,98
<b>d92</b>	19,64	20,24	20,32	20,32	20,66
<b>d95</b>	19,95	20,33	20,46	20,49	21,20
<b>d99</b>	20,03	20,65	20,48	20,73	21,36
<b>d102</b>	20,13	20,68	20,35	21,00	21,74
<b>d106</b>	20,13	20,39	20,25	20,50	21,26
<b>d109</b>	20,09	20,14	20,02	20,46	21,98
<b>d113</b>	20,02	19,76	19,82	20,17	23,06
<b>d116</b>	19,96	19,93	19,58	20,07	22,30
<b>d120</b>	19,45	19,39	18,95	19,60	22,32
<b>d123</b>	19,29	19,33	19,28	19,20	22,72
<b>d127</b>	18,59	18,95	18,97	18,49	23,38
<b>d130</b>	18,53	18,40	19,16	17,99	23,42
<b>d134</b>	18,05	17,99	18,40	17,87	23,40
<b>d137</b>	18,19	17,16	18,17	18,08	23,72
<b>d141</b>	17,36	16,83	18,38	17,27	24,60
<b>d144</b>	17,58	16,45	17,92	16,80	24,70
<b>d148</b>	19,13	16,05	17,70	16,55	23,70
<b>d151</b>	18,80	-	17,00	17,10	24,58

**Tabelle 5: Mittleres Gewicht der Versuchsgruppen an den entsprechenden Versuchstagen**

### **3.6. Novel Object Recognition Test**

Die Auswertung des Novel Object Recognition Test (NOR) wurde, wie im Methodenteil beschrieben, mit Hilfe der Software EthoVision XT Version 8 (Noldus, Wageningen, Niederlande) durchgeführt. Dabei wurden gezielt die Parameter „Zurückgelegte Distanz“, „Zeit ohne Bewegung“ und der „Diskriminations-Index“ ausgewertet. Wie erwartet entstanden dadurch, dass sich die Mäuse während der Datenerhebung teilweise nicht bewegten und somit keine Daten hinsichtlich der Diskrimination generieren konnten, fehlende Werte für einzelne Testtage (siehe Tabelle 6). Die verschiedenen Gründe hierfür werden in der Diskussion erörtert. Für die Auswertung wurden die fehlenden Daten, wie im Analyseplan beschrieben, ergänzt.



Versuchstag	N	Fehlend	
		Anzahl	Prozent
d50	57	6	9,5
d88	58	5	7,9
d102	47	16	25,4
d116	55	8	12,7

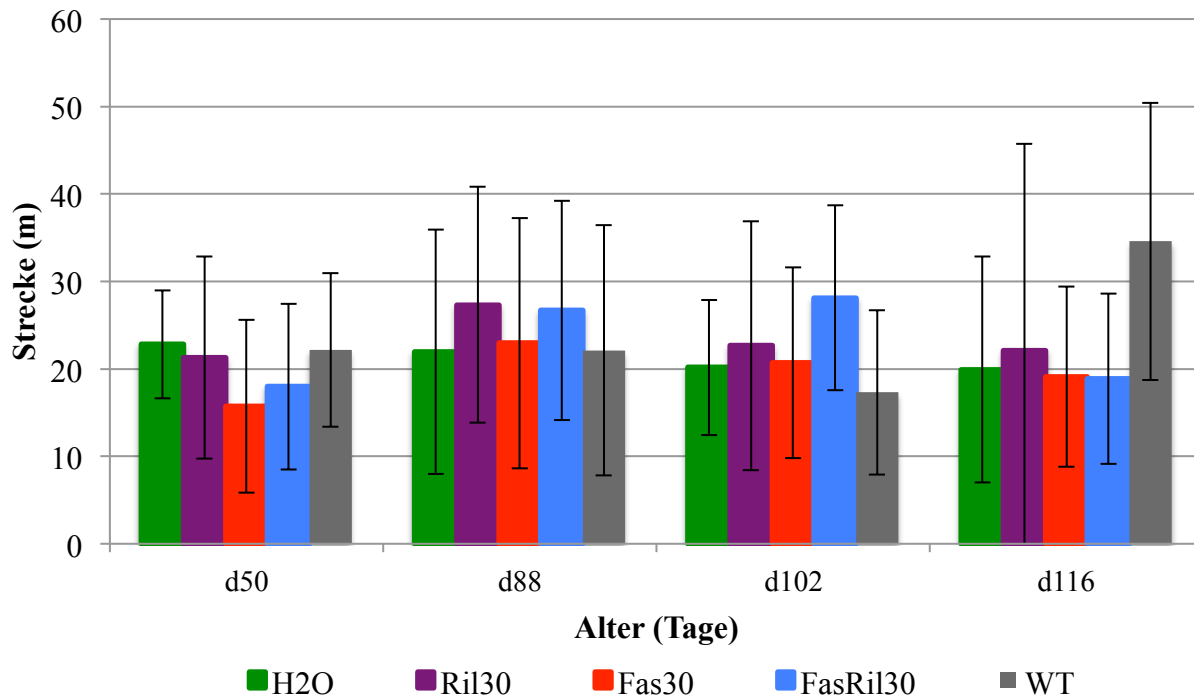
**Tabelle 6: Anzahl der fehlenden Werte pro Testtag**

### 3.6.1. Zurückgelegte Distanz

Bei Betrachtung der zurückgelegten Distanz fällt zunächst auf, dass diese an den einzelnen Testtagen variiert und an allen Tagen eine große Streuung der Daten in allen Gruppen vorliegt. Wie in Tabelle 7 und Abbildung 20 gezeigt, stieg der Mittelwert der Laufleistung über alle Behandlungsgruppen hinweg von d50 zu d88 an, um danach an Tag 102 wieder zu fallen und an d116 erneut anzusteigen.

Gruppe	d50	d88	d102	d116
Ril30	22,88	26,59	21,85	22,13
H <sub>2</sub> O	21,34	22,34	16,38	22,23
Fas30	16,38	21,86	17,33	24,09
FasRil30	17,97	28,03	25,78	21,55
WT	22,18	22,12	17,31	34,59
Mittelwert	19,85	24,52	20,12	23,44

**Tabelle 7: Gemittelte zurückgelegte Distanz (m), differenziert nach Testtag und Gruppe**



**Abbildung 20: Zurückgelegte Distanz (m), differenziert nach Testgruppe und Testtag**

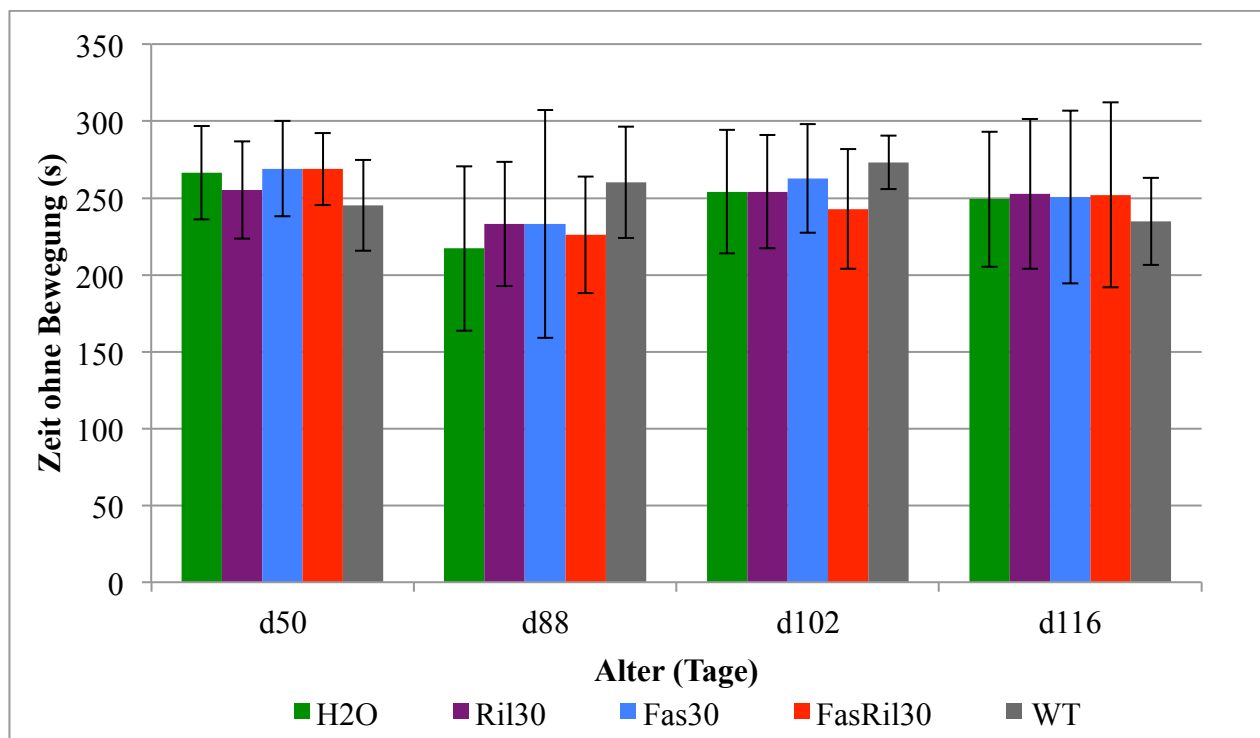
H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe (n=14); Ril30: 30 mg Riluzol/kg (n=14); Fas30: 30 mg Fasudil/kg (n=14); FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (n=14); WT: Gesunde Wildtypen (n=5). Die Darstellung dient der Übersicht; die x-Achsen Intervalle sind nicht linear skaliert. Die Fehlerbalken entsprechen  $\pm 1$  SD.

Nach multipler Imputation wurden die Daten durch eine ANOVA mit Messwiederholung analysiert. Es konnte kein signifikanter Einfluss des Innersubjektfaktors „Zeit“ auf die Variable „Zurückgelegte Strecke“ und damit keine Veränderung der Laufstrecke über die Zeit gezeigt werden ( $F_{(2,598)} = 1,383$ ;  $p = .250$ ;  $\eta^2 = .023$ ). Eine statistische Interaktion der Faktoren „Zeit“ und „Gruppe“, welche einen Gruppeneinfluss gezeigt hätte, bestand nicht ( $F_{(10,392)} = 1,051$ ;  $p = .404$ ;  $\eta^2 = .068$ ). Auch nach Ausschluss der Wildtypen zeigte sich bei der Analyse der Versuchsgruppen kein Einfluss der Zeit auf die Strecke ( $F_{(7,141)} = 0,944$ ;  $p = .477$ ;  $\eta^2 = .050$ ), sodass von weiteren Analysen abgesehen wurde.

Zusammengefasst ergaben sich somit trotz der deskriptiven Abweichungen bezüglich der zurückgelegten Strecke keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen an allen vier Testtagen. Auch unterschied sich die zurückgelegte Strecke an den einzelnen Testtagen nicht signifikant.

### 3.6.2. Zeit ohne Bewegung

Die Zeit ohne Bewegung entsprach der Zeit, in der die Mäuse still in der Versuchsarena saßen und sich nicht bewegten. Bei einer Zeit von 300 Sekunden pro Test-Durchlauf konnten die Mäuse, wenn sie sich gar nicht bewegten, folglich für diesen Parameter höchstens einen Wert von 300 Sekunden erreichen. Die erhobenen Daten zeigten insgesamt sehr hohe Werte, was sich in einem Mittelwert aus allen durchgeführten Durchläufen aus allen Testtagen von 249,5 Sekunden widerspiegelte. Weiterhin zeigte sich, was bei Betrachtung der Abbildung 21 deutlich wird, dass die Werte zwischen den Gruppen und den Testtagen kaum variierten. Alle Mittelwerte lagen zwischen 200 und 300 Sekunden, und es lässt sich kein Trend einer Gruppe erkennen, sich mehr oder weniger zu bewegen als die anderen Gruppen. Auffällig ist jedoch, dass der generelle Mittelwert aller Gruppen von Tag 50 (261,03s) über Tag 102 (257,38s) bis zu Tag 116 (247,88s) abnahm. Der niedrigste Wert fand sich an Tag 88 (233,95s).



**Abbildung 21: Mittelwerte der Zeit ohne Bewegung (s) der Testgruppen an vier Testtagen**  
H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe (n=14); Ril30: 30 mg Riluzol/kg (n=14); Fas30: 30 mg Fasudil/kg (n=14); FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (n=14); WT: Gesunde Wildtypen (n=5). Die Darstellung dient der Übersicht; die x-Achsen Intervalle sind nicht linear skaliert. Die Fehlerbalken entsprechen  $\pm 1$  SD.

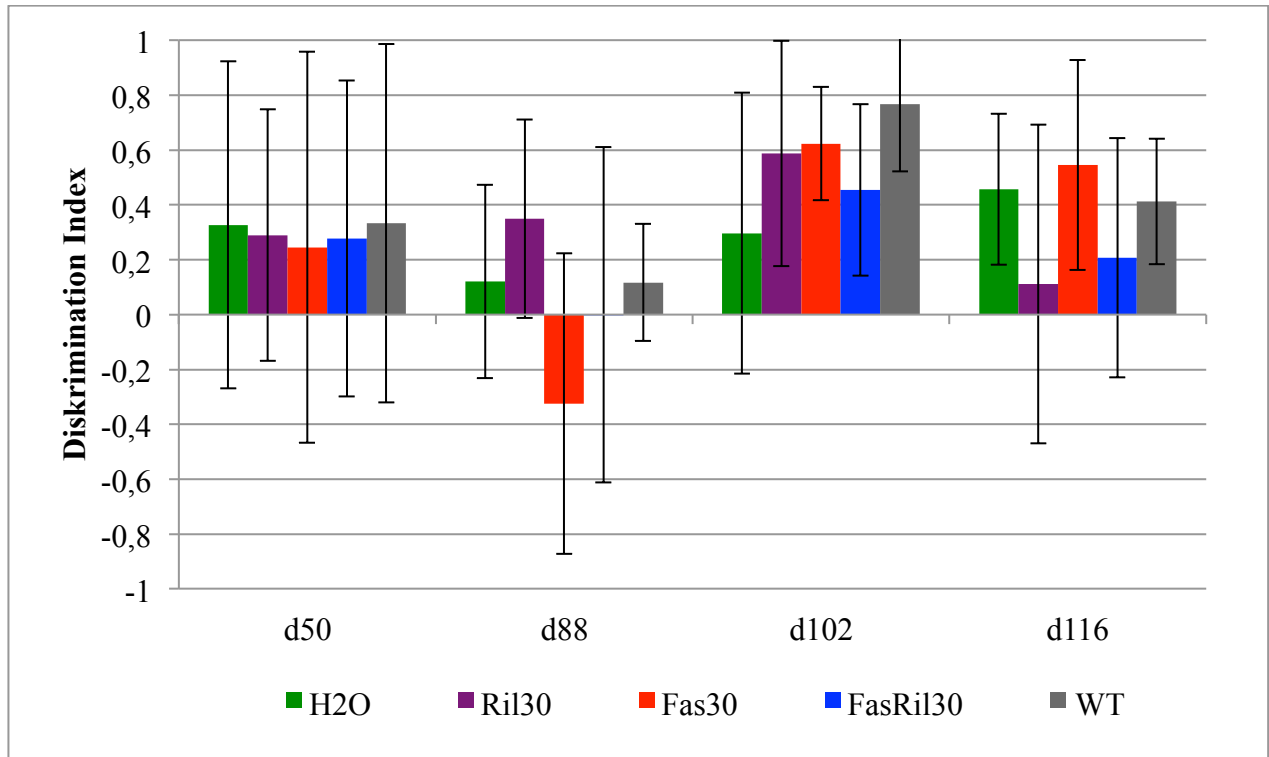
In der statistischen Analyse durch eine ANOVA mit Messwiederholung zeigte sich nach dem Vervollständigen fehlender Messwerte durch multiple Imputation ein signifikanter Einfluss des Innersubjektfaktors „Zeit“ auf die Variable „Zeit ohne Bewegung“, und damit eine Veränderung der Zeit ohne Bewegung über die Versuchstage ( $F_{(2,524)} = 5.854$ ;  $p = .002$ ;  $\eta^2 = .092$ ). Eine Interaktion der Gruppenvariable mit der Variable „Zeit ohne Bewegung“, und damit ein Gruppeneinfluss auf diese Zeit, konnte nicht nachgewiesen werden ( $F_{(10,097)} = 0,965$ ;  $p = .477$ ;  $\eta^2 = .062$ ).

Zusammenfassend zeigen sich an den einzelnen Testtagen signifikant unterschiedliche Zeiten, welche die Mäuse ohne Bewegung verbrachten, jedoch finden sich keine Unterschiede bezüglich der Versuchsgruppen.

### 3.6.3. Diskriminations-Index (DI)

In der Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Auswertung der Diskriminations-Index (DI) Analyse des NOR-Tests zusammengefasst. Es zeigte sich als Ausgangswert an Tag 50 in allen Gruppen ein DI um ca. 0,3 und damit eine klare Präferenz für das neue Objekt.

An Tag 88 variierten die Gruppen insgesamt stark; die Fas30-Gruppe zeigte mit einem Wert von -0,323 den niedrigsten Wert, welcher eine Präferenz für das bekannte Objekt widerspiegelt. Die Gruppe FasRil30 präferierte mit einem Wert von 0,005 keines der beiden Objekte. Die beiden anderen SOD-G93A-Gruppen und die Wildtypen zeigten höhere Werte (Ril30 = 0,349; H<sub>2</sub>O = 0,120 und WT = 0,203) und präferieren somit weiterhin das neue Objekt. Am dritten Testtag (d102) fand sich erneut eine größere Streuung der Mittelwerte zwischen einem DI von 0,2 und 0,8. Es ist auffällig, dass die Fas30-Gruppe, welche an Tag 88 noch einen negativen Wert aufgewiesen hatte, nun mit einem Wert von 0,623 den zweithöchsten DI zeigte. An Tag 116 lagen erneut alle Werte im positiven Bereich. Die höchsten Wert wies die Fas30-Gruppe auf (DI = 0,597), wohingegen die Ril30-Gruppe den geringsten Wert zeigte (DI = 0,115).



**Abbildung 22: Mittelwerte des DI pro Versuchstag und Versuchsgruppe**

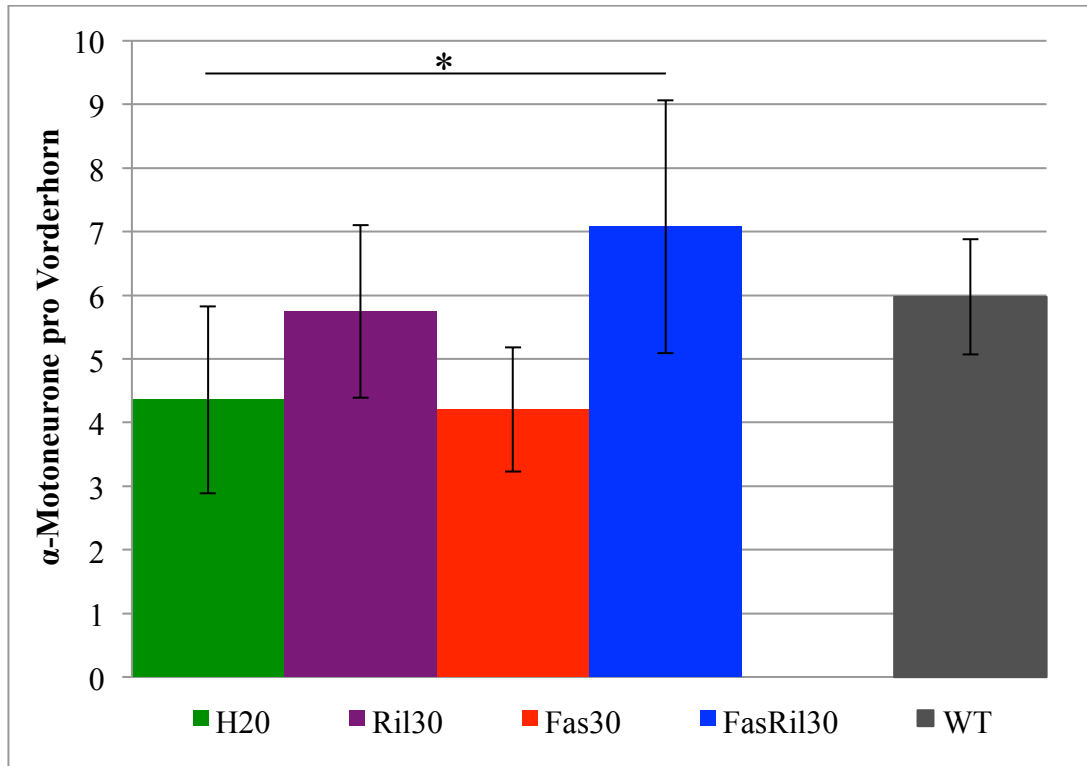
H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe (n=14); Ril30: 30 mg Riluzol/kg (n=14); Fas30: 30 mg Fasudil/kg (n=14); FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (n=14); WT: Gesunde Wildtypen (n=5). Die Darstellung dient der Übersicht; die x-Achsen Intervalle sind nicht linear skaliert. Die Fehlerbalken entsprechen  $\pm 1$  SD.

Die statistische Analyse aller Gruppen erfolgte durch eine ANOVA mit Messwiederholung. Es konnte ein signifikanter Einfluss des Innersubjektfaktors „Zeit“ auf die Variable „Diskriminations-Index“, und damit eine generelle Veränderung des DI über den Versuchszeitraum gezeigt werden ( $F_{(3)} = 9,074$ ;  $p < .001$ ;  $\eta^2 = .142$ ). Außerdem konnte eine Interaktion der einzelnen Gruppen mit der Variable „Zeit“ gezeigt werden ( $F_{(12)} = 2,072$ ;  $p = .021$ ;  $\eta^2 = .131$ ), was eine gruppenspezifische Änderung der DI Werte im Versuchsverlauf belegt. Nach Ausschluss der Wildtypen für die weitere Analyse zeigte sich erneut eine generelle Veränderung des DI über die Zeit ( $F_{(3)} = 8,112$ ;  $p < .001$ ;  $\eta^2 = .137$ ) und eine Interaktion der Variablen ( $F_{(9)} = 2,593$ ;  $p = .008$ ;  $\eta^2 = .132$ ). Dieser Unterschied lies sich mittels univariater ANOVA an Tag 88 zwischen der Fas30-Gruppe und der Ril30-Gruppe ( $p = .006$ ) zeigen ( $F_{(3)} = 4,793$ ;  $p = .005$ ;  $\eta^2 = .220$ ). An den anderen Testtagen zeigten sich keine Gruppenunterschiede. Zusammenfassend zeigt sich an Testtag 88, verglichen mit den anderen Testtagen, ein divergierendes Unterscheidungsvermögen zwischen neuem und altem Objekt. Dieses wurde durch den relativ niedrigen DI der Fas30-Gruppe verursacht und führte zu einem signifikanten Unterschied zur Ril30-Gruppe, allerdings nicht zur Kontrollgruppe. Das bedeutet, dass die Fas30

Gruppe das neue Objekt an diesem Versuchstag schlechter vom alten Objekt unterscheiden konnte als die Ril30 Gruppe. Es finden sich an den anderen Versuchstagen keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

### **3.7. Histologische Untersuchung des Rückenmarks in einer Querschnittsstudie**

Die Anzahl der  $\alpha$ -Motoneurone pro Vorderhorn am 120. Lebenstag zeigte für die Versuchsgruppen verschiedene Werte auf, die in Abbildung 23 dargestellt sind. Die mit Fas30 behandelten Tiere hatten mit im Mittel 4,2  $\alpha$ -Motoneuronen pro Vorderhornquerschnitt den geringsten durchschnittlichen Wert. Mit einem Wert von 4,35 pro Vorderhornquerschnitt hatten die mit H<sub>2</sub>O behandelten Tiere eine knapp höhere Anzahl. Darauf folgten die Ril30-Gruppe (5,75  $\alpha$ -Motoneurone pro Vorderhornquerschnitt) und die FasRil30-Gruppe mit im Mittel 7,07 Motoneuronen pro Vorderhorn. Die gesunden Wildtypen kamen auf im Mittel 5,97 Motoneurone. In der statistischen Analyse mit einem t-Test bei unverbundenen Stichproben zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe FasRil30 und der Kontrollgruppe ( $T_{(8)} = 2,539$ ;  $p = .035$ ). Die anderen Behandlungsgruppen unterscheiden sich nicht von der Kontrollgruppe. Zusammengefasst zeigt nur die Kombinationsbehandlungsgruppe eine höhere Anzahl von  $\alpha$ -Motoneuronen als die mit Wasser behandelte Kontrollgruppe.



**Abbildung 23: Durchschnittliche Anzahl der  $\alpha$ -Motoneurone im Vorderhorn des Rückenmarks**

H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe (n = 5); Ril30: 30 mg Riluzol/kg (n = 5); Fas30: 30 mg Fasudil/kg (n = 5); FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (n = 5). Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte  $\pm$  Standardfehler. \* =  $p < 0.05$ .

## 4. Diskussion

### 4.1. Ergebnisse der präsymptomatischen Behandlungsstudie mit Fasudil und Riluzol

Das Ziel der präsymptomatischen, randomisierten und kontrollierten Behandlungsstudie war die Untersuchung von potentiell positiven Effekten einer Kombinationsbehandlung aus Fasudil und Riluzol auf das Überleben, den Krankheitsverlauf und die klinische Funktionalität im SOD-G93A-Mausmodell der ALS sowie die Überprüfung von positiven Effekten von Riluzol bzw. Fasudil in Monotherapie. Alle Untersuchungen erfolgten verblindet und wurden von demselben Untersucher durchgeführt.

#### 4.1.1. Überleben

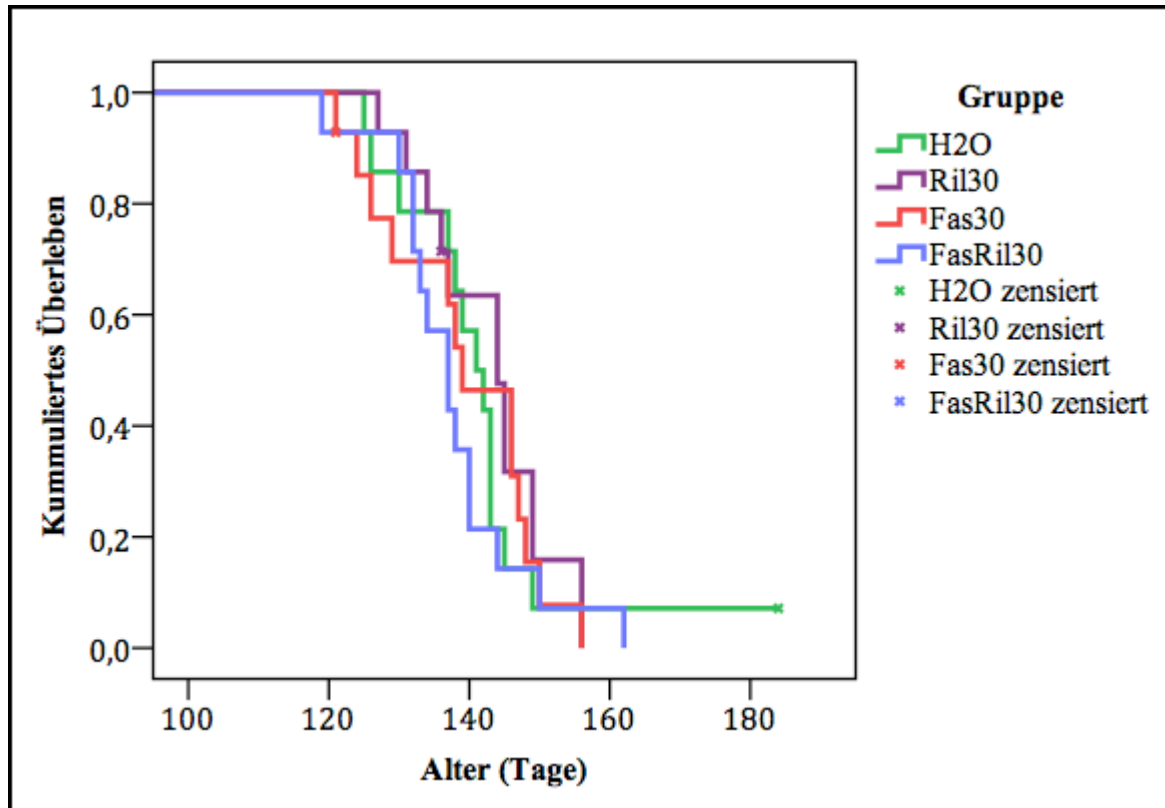
Um die durchschnittliche Überlebensdauer der Versuchstiere zu erfassen, wurden diese täglich klinisch untersucht und beim Erreichen der im Methodenteil beschriebenen Abbruchkriterien eingeschläfert. Der Tag des Einschläferns wurde dabei als maximal erreichter Lebenstag gezählt. Deskriptiv zeigten sich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen und der Behandlungsgruppe allenfalls kleine Unterschiede von wenigen Tagen (Ril30 =  $143 \pm 2.4$  Tage, H<sub>2</sub>O =  $142 \pm 3.754$  Tage, Fas30 =  $139 \pm 3.0$  Tage, FasRil30 =  $138 \pm 2.7$  Tage). Die statistische Analyse des Überlebens konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe nachweisen, weshalb die Hypothese des längeren Überlebens unter präsymptomatischer Kombinationsbehandlung mit Fasudil und Riluzol nicht bestätigt werden konnte. Auch eine Monotherapie mit Fasudil oder Riluzol verlängerte das Überleben der Versuchstiere nicht, was zum Verwerfen der ersten Hypothese führte.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch sowohl zu den Ergebnissen aus unserer Forschungsgruppe (Tönges et al. 2013; Günther 2015) als auch zu den Daten von Takata et al. (2013), die eine Überlebenszeitverlängerung von SOD-G93A-Mäusen unter Monotherapie mit Fasudil 30 mg/kg nachweisen konnten.

Für die Abweichung der Ergebnisse dieses Experiments von den Vorergebnissen unserer Arbeitsgruppe und von den in der Literatur berichteten Ergebnissen hinsichtlich der Behandlung mit Fasudil gibt es mehrere mögliche Ursachen. Beispielsweise bewirkt die geringe Stichprobengröße von 14 Tieren pro Versuchsgruppe in diesem Experiment eine hohe Anfälligkeit der Daten für Ausreißer. Kleine Stichprobengrößen sind allerdings bei In-vivo-



Studien durch den hohen Aufwand der Experimente bedingt und üblich Somit können nur wenige Tiere, die zu einem sehr frühen oder zu einem sehr späten Zeitpunkt verstorben sind, möglicherweise einen großen Einfluss in der statistischen Auswertung haben. Die Empfehlung einer Arbeitsgruppe, welche die optimale Versuchstieranzahl für ALS-Mausmodelle herausgearbeitet hat, liegt bei 24 Tieren pro Gruppe (Ludolph et al. 2010). In diesem Experiment wurden allerdings auf Grund der zweifach-positiven Daten von Tönges et al. (2012) und Takata et al. (2013) konservative Gruppengrößen gewählt. Bei der Betrachtung von Abbildung 9 fällt auf, dass es beispielsweise in der mit Wasser behandelten Kontrollgruppe einen Ausreißer gibt. Dieses Tier lebte 184 Tage und damit 42 Tage (22,8%) länger als der Durchschnitt. Es zeigte an Tag 137 die ersten Symptome von schwerer Krankheit, das bedeutet circa eine Woche später als der Gruppendurchschnitt (126 Tage). Eine Wiederholung der Überprüfung des Mutationsträgerstatus zum Ausschluss eines Sequenzierungsfehlers zeigte den eindeutigen Nachweis einer SOD1-G93A-Mutation, womit das Tier korrekt als transgen eingestuft worden war. Um zu überprüfen, ob sich statistische Signifikanzen ohne dieses Versuchstier zeigen würden, wurde es als Ausreißer zensiert und eine erneute Analyse mit Hilfe eines Log-Rank-Tests durchgeführt. Dieser Test zeigte jedoch keinen signifikanten generellen Unterschied zwischen den Gruppen ( $\chi^2_{(3)} = 1,579$ ;  $p = .664$ ), sodass von weiteren paarweisen Vergleichen abgesehen wurde. Es konnte somit gezeigt werden, dass das Ergebnis nicht auf Grund von eingeschlossenen Ausreißern entstanden ist (vgl. Abbildung 24).



**Abbildung 24: Kaplan – Meier – Diagramm über das Überleben der Behandlungsgruppen mit zensiertem Outlier in der Kontrollgruppe**

H<sub>2</sub>O: Kontrollgruppe; Ril30: 30 mg Riluzol/kg; Fas30: 30 mg Fasudil/kg; FasRil30: Sowohl 30 mg Riluzol/kg als auch 30 mg Fasudil/kg (jeweils n = 14).

Ein weiterer Grund für die Abweichung der Ergebnisse gegenüber Vorgängerstudien könnte die kontinuierliche Nahrungsaufnahme der Mäuse bis zum klinischen Endpunkt des Experiments sein, welche die Ergebnisse aller Versuchsgruppen gleichermaßen beeinflusst haben kann. Es lässt sich im Vergleich mit den Daten von Takata et al. (2013) feststellen, dass die Versuchstiere im vorliegenden Experiment insgesamt im Mittel deutlich länger gelebt haben, obwohl die Dauer der Behandlung, die Menge der applizierten Versuchssubstanz und die Art der Applikation identisch waren. Die Fas30-Gruppe aus dem vorliegenden Experiment lebte, verglichen mit der Behandlungsgruppe aus der Literatur, neun Tage länger (Mean = 139; SEM = 3,041 vs. Mean = 130,2; SEM = 1,9) (Takata et al. 2013). Dieses verlängerte Überleben könnte das Resultat der Bereitstellung von Futterschalen mit aufgelösten Futterpallets für die Mäuse sein, welche im vorliegenden Experiment ab einem klinischen Score von II eingeleitet wurde (vgl. Kapitel 2.6). Das Auflösen der Futterpellets, welches den Mäusen eine kontinuierliche Nahrungsaufnahme bis zu ihrem Tod ermöglichte, ist im Paper von Takata et al. (2013) nicht beschrieben, wurde jedoch in den Vorexperimenten unserer Arbeitsgruppe in identischer Art durchgeführt. Die Tiere zeigten

hier ein mit dieser Studie vergleichbares mittleres Überleben von 137 Tagen (Günther 2015). Da auch in den Vorexperimenten Unterschiede nachweisbar waren, ist der Einfluss einer kontinuierlichen Nahrungsaufnahme auf das Ergebnis als gering anzusehen, zumal diese Bedingung für alle Mäuse identisch war.

Bemerkenswert ist weiterhin, dass eine Monotherapie mit Riluzol 30 mg/kg in den eingangs erwähnten Studien das Überleben der Versuchstiere – zwar nur marginal aber signifikant – um wenige Tage verlängerte (Gurney et al. 1996; Angelov et al. 2003; Waibel et al. 2004), wobei in erst- und letztgenannter Studie das Konfidenzintervall der Behandlungsgruppe den Mittelwert der Kontrollgruppe mit einschließt und somit eine wirkliche Signifikanz der Überlebensverlängerung fraglich erscheint. Trotz dieser Zweifel erweisen sich die in diesem Experiment erhobenen Daten somit als formal inkonsistent zu den Ergebnissen der angeführten Arbeiten, weil in diesem Experiment keine Überlebensverlängerung durch Riluzol allein nachgewiesen werden konnte. Es ist daher anzunehmen, dass der positive Effekt von Riluzol auf das Überleben, welcher bei ALS erkrankten Menschen auch in Metaanalysen wiederholt nachgewiesen wurde (Miller et al. 2012), im SOD1-G93A-Mausmodell nicht konsistent nachweisbar ist.

#### 4.1.2. Klinischer Score

Der Krankheitsbeginn lag in der Ril30-Gruppe an Tag 105 (SEM = 4,95), in der H<sub>2</sub>O-Gruppe an Tag 101 (SEM = 3,55), in der Fas30-Gruppe an Tag 92 (SEM = 3,85) und in der FasRil30-Gruppe an Tag 108 (SEM = 3,17) (vgl. Abbildung 10). Weiterhin konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Fas30 und FasRil30 ( $p = .037$ ), nicht jedoch zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Es zeigt sich somit, dass sowohl die präsymptomatische Behandlung mit Riluzol oder Fasudil als auch die Kombinationsbehandlung aus den beiden Substanzen nicht in der Lage ist, den Eintritt der Krankheit im SOD-G93A-Mausmodell zu verzögern.

Der Beginn der schweren Krankheit lag im Mittel für die H<sub>2</sub>O-Gruppe an Tag 126 (SEM = 2,66), für die Ril30-Gruppe an Tag 135 (SEM = 3,35), für die Fas30-Gruppe an Tag 121 (SEM = 2,64) und für die FasRil30-Gruppe an Tag 127 (SEM = 1,97) (vgl. Grafik 11). Weiterhin zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe Fas30 und Ril30, jedoch keine Unterschiede der Versuchsgruppen zu der Kontrollgruppe. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass eine

Behandlung der Tiere mit Fas30, Ril30 oder mit einer Kombinationstherapie aus beiden Substanzen keinen Einfluss auf den Beginn der schweren Krankheit hat. Dieses Ergebnis könnte suggerieren, dass eine präsymptomatische Behandlung keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat. Dies ist nicht unwahrscheinlich, da ein neuroprotektiver Effekt im verwendeten Modell sehr groß sein müsste, um einen statistisch signifikanten Gruppenunterschied zu zeigen. Dies liegt zum einen an der kurzen Lebensdauer der transgenen Tiere und an der schnellen Krankheitsprogression, welche eine Detektion von Unterschieden sowohl im Krankheitsbeginn als auch im -verlauf erschwert. Dies ist unter anderem erkennbar an den großen Standardabweichungen beim Krankheitsbeginn von 3,17 bis 4,95 Tagen, was bei einem Erkrankungsalter von ca. 100 Tagen 3-5% der Lebenszeit entspricht. Für eine genauere Untersuchung wären höhere Versuchstierzahlen notwendig. Wie bereits erwähnt, wurden in diesem Experiment allerdings auf Grund der zweifach-positiven Daten von Tönges et al. (2012) und Takata et al. (2013) konservative Gruppengrößen gewählt.

Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kombinationsbehandlungsgruppe und der mit Fasudil behandelten Gruppe für den Krankheitsbeginn und zwischen der Ril30-Gruppe und der Fas30-Gruppe erscheinen fragwürdig, da keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe gezeigt werden konnten. Ein negativer Effekt von Fasudil allein auf den Krankheitsbeginn und -verlauf ist daher nicht nachweisbar. Die gute Verträglichkeit von Fasudil, welche in den Vorstudien zu diesem Experiment beschrieben wurde, kann somit erneut nachgewiesen werden (Günther 2015).

#### 4.1.3. Gewicht

Das Gewicht diente, wie in der Einleitung beschrieben, als klinischer Parameter des Gesundheitszustands der Tiere. Im Vorfeld wurde davon ausgegangen, dass es im Verlauf des Experiments zunächst mit dem Altern und dem damit verbundenen Wachstum der Tiere ansteigen und danach bei den transgenen Versuchstieren durch die progressive Muskelatrophie sinken würde. Diese Vermutung wurde durch das Experiment bestätigt (vgl. Abbildung 19). Die statistische Analyse konnte allerdings während der gesamten Dauer des Experiments keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Versuchsgruppe feststellen. Ab Versuchstag 92 erreichen die Wildtypen konstant höhere durchschnittliche Gewichtswerte als die transgenen Tiere, unabhängig von ihrer Behandlung. Der klinische Krankheitsbeginn, der für die

Versuchstiere in dieser Studie im Durchschnitt auf Tag 95 bis 105 fällt, führt wahrscheinlich zu der deskriptiv sichtbaren Stagnation des Gewichts. Statistisch ließ sich mittels einer ANOVA mit Messwiederholung bis einschließlich Versuchstag 109 kein Unterschied zwischen den Versuchstiergruppen und den Wildtypen nachweisen. Folglich ergibt sich eine Divergenz zu den Ergebnissen von Smittkamp et al. (2008), die an Tag 108 einen signifikanten Unterschied zeigen konnten. Die von in einer anderen Arbeit bereits ab der zweiten Lebenswoche beschriebene Gewichtsdivergenz der Gruppen konnte nicht gezeigt werden und wirft auf Grund der Konsistenz der Daten aus Literatur, Vorexperimenten und den Ergebnissen dieser Studie Zweifel an der Korrektheit dieser Daten auf (Miana Mena et al. 2009).

Es zeigte sich somit zusammenfassend, dass das Gewicht der transgenen Versuchstiere im Verlauf des Experiments deskriptiv ab einem bestimmten Zeitpunkt krankheitsbedingt gegenüber den Wildtypen stagniert. Da statistisch zu keiner Zeit Unterschiede gezeigt werden konnten, kann das Gewicht jedoch weder als geeignetes Maß für eine allgemeine Früherkennung des Krankheitsbeginns noch als Unterscheidungskriterium zwischen bestimmten Behandlungsgruppen dienen. Auf Grund dessen sollte in zukünftigen Experimenten von weiteren Analysen des Gewichts abgesehen und stattdessen ein anderer klinischer Parameter, beispielsweise der in diesem Experiment ebenfalls erhobene klinische Score, zur Hauptbeurteilung des Gesundheitszustandes der Versuchstiere verwendet werden.

#### 4.1.4. Motorische Leistungsfähigkeit im Drehwalzentest

In diesem Experiment wurde die motorische Leistungsfähigkeit der Versuchstiere multimodal mit dem Drehwalzentest Rotarod und dem Ganganalysesystem Catwalk XT getestet, um mögliche Unterschiede der Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe aufzudecken.

Der Versuchsaufbau des Drehwalzentests wich gegenüber den Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe ab, da statt einer kontinuierlichen Rotationszahl ein Paradigma mit Beschleunigung gewählt wurde (Günther 2015). Dieses war in ähnlicher Form bereits in anderen in der Literatur beschriebenen Experimenten verwendet worden (Klivenyi et al. 1999; Mead et al. 2011). Das Rational hinter dieser Änderung war eine Erschwerung des Versuchs an den frühen Versuchstagen, um einen Abbau der motorischen Leistungsfähigkeit zu einem früheren Zeitpunkt aufdecken zu können, da die schleichend beginnenden Paralysen in einem zu einfachen Test mit einer geringeren konstanten Rotationszahl durch einen Deckeneffekt eventuell länger unerkant

bleiben. Weiterhin sollten die Tiere im fortgeschrittenen Krankheitsstadium zumindest eine kurze Zeit auf der Walze laufen können, um auch an diesen Tagen eine größere Detektionsbreite des Tests zu gewährleisten. Somit sollte ein frühzeitiger Bodeneffekt vermieden werden.

Bei Betrachtung der Ergebnisse (vgl. Abbildung 14) zeigt sich der Erfolg des neuen Paradigmas daran, dass die Gruppe der gesunden Wildtypen, also die Positivkontrolle, im Durchschnitt an keinem Versuchstag den Maximalwert von 300 Sekunden erreicht. Dies kann als Bestätigung dafür angesehen werden, dass der Test nicht zu einfach war und wie erhofft kein Deckeneffekt eintrat. Weiterhin lässt sich Tabelle 3 entnehmen, dass die transgenen Tiere schon von Beginn des Experimentes im deskriptiven Vergleich schlechter waren als die Wildtypen. Eine Erhöhung der Versuchstieranzahl in der Gruppe der Wildtypen hätte eventuell dazu geführt, dass bereits an frühen Versuchstagen ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtypen und den transgenen Tieren nachweisbar gewesen wäre. Statistisch zeigten sich bis Tag 109 keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse sind ebenfalls inkonsistent zu den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Tönges et al. 2013), in denen ein positiver Einfluss der präsymptomatischen Behandlung mit Fasudil bei weiblichen Tieren nachgewiesen werden konnte. Bei männlichen Tieren hatte sich kein positiver Einfluss auf die Performance auf dem Drehwalzentest gezeigt (Günther 2015; Günther et al. 2017).

Auch in diesem Fall könnte eine zu geringe Stichprobengröße für die Variabilität der Ergebnisse verantwortlich sein. Allerdings lässt sich der deskriptive Eindruck von zwei Kurven-Verlaufsarten – auf der einen Seite die Kontrollgruppe und die Kombinationsbehandlungsgruppe, auf der anderen Seite die beiden Gruppen mit Monotherapie – auf diese Weise nicht schlüssig erklären (vgl. Abbildung 14). Vielmehr sind die Fas30- und Ril30-Gruppe von Tag 57 bis Tag 102 deskriptiv schlechter als die beiden anderen Gruppen. Der Gedanke einer eventuell bereits ab Versuchsbeginn bestehenden Gruppendifferenz lässt sich durch mangelnde statistische und deskriptive Divergenz an Tag 50 und 53 widerlegen. Die genauen Gründe für die Ergebniskonstellation bleiben daher unklar. Da sich die Gruppen statistisch auf Grund der hohen Varianz an den einzelnen Testtagen nicht unterscheiden, sollten die Ergebnisse jedoch nicht überinterpretiert werden. Es wird weder statistisch suggeriert noch ist es inhaltlich plausibel, dass sowohl Riluzol als auch Fasudil – beides neuroprotektive Substanzen – eine Verschlechterung der motorischen Leistungsfähigkeit bewirken.

#### 4.1.5. Motorische Leistungsfähigkeit im Ganganalysetest

Durch den Ganganalysetest wurden Parameter des Gangbilds der Mäuse über den Versuchszeitraum wöchentlich aufgezeichnet. Die Parameter Schrittlänge der Vorderbeine (*stride length*), Fläche der Fußabdrücke der Hinterläufe (*print area*), die Schrittzeit (*swing speed*) und Dauer eines Laufs (*run duration*) waren bereits in früheren Arbeiten untersucht worden; allerdings waren erst spät Veränderungen der SOD-G93A-Tiere gegenüber den Wildtypen aufgefallen (Knippenberg et al. 2010) oder die Ergebnisse waren früh aufgetreten und hatten sich wieder zurückgebildet (Mead et al. 2011). Ein Vergleich von verschiedenen Behandlungsgruppen war bisher nicht erfolgt.

Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen bezüglich des Vergleichs der gesunden Wildtypiere und der transgenen Tiere ähnliche Ergebnisse wie die beschriebene Arbeit von Knippenberg et al. (2010), allerdings ließ sich ein solcher Unterschied zwischen diesen Gruppen nur für die Schrittgeschwindigkeit ab Tag 113 und für die Schrittlänge gegen Ende des Versuchszeitraums zeigen. Für die Fläche des Pfotenabdrucks zeigte sich ein Trend zu einem Unterschied und für den Parameter Laufdauer ließen sich – abweichend von dem Vorexperiment – keine Unterschiede feststellen. Signifikante Differenzen der Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe oder zwischen den Behandlungsgruppen ließen sich für keinen Parameter feststellen. Dies erscheint bei Betrachtung der Abbildungen 15, 16, 17 und 18 zunächst anders, da die Kurven besonders in der zweiten Hälfte des Versuchszeitraums klar abweichende Verläufe haben und deskriptiv auch über einen längeren Zeitraum voneinander abweichen. Der Grund der fehlenden statistischen Signifikanz liegt hier jeweils in der großen Streuung der einzelnen Werte (vgl. exemplarisch Tabelle 4), welche sich bei allen untersuchten Gangbild-Parametern zeigte. Verschiedene Faktoren, die sich durch die Krankheitsfolgen während des Experiments änderten, wie z. B. Größe, Gewicht oder Gesundheitszustand der Versuchstiere, scheiden als Gründe für die große Streuung aus, da die hohe Streuung über den gesamten Experimentalzeitraum persistiert. Auch systematische Fehler, wie beispielsweise Reihenfolgeeffekte oder tageszeitabhängige Messunterschiede, scheinen unwahrscheinlich, da kein spezifisches Muster der Streuung zu erkennen ist. Vielmehr scheint die Methodik an sich zu einer hohen Streuung zu führen. In zukünftigen Experimenten sollte diese Streuung zunächst durch eine Erhöhung der Anzahl der Versuchstiere und durch weitere Vorexperimente zu den verschiedenen Parametern überprüft werden, da die Aussagekraft der Methode gemessenen Daten ansonsten begrenzt bleibt.

#### 4.1.6. Kognitive Leistungsfähigkeit

Die Ergebnisse des NOR-Tests zeigen, dass die Versuchstiere während des Versuchszeitraums an allen Messzeitpunkten, außer an Tag 88, das neue Objekt deutlich mehr explorierten als das Alte, unabhängig von ihrer Behandlungsgruppe. Wie eingangs beschrieben, kann die Zeit der Exploration der beiden Objekte in ein Verhältnis gesetzt werden, um einen Diskriminations-Index (DI) zu bilden. Mit diesem kann festgestellt werden, ob sich die Tiere an das Objekt, welches sie schon kennen, erinnern und somit zwischen altem und neuem Objekt differenzieren können (Ennaceur und Delacour 1988). In diesem Experiment zeigten sich entsprechend der Erwartungen keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich dieses Index an den Versuchstagen 50, 102 und 116. Daher konnte die dritte Hypothese, dass eine SOD1-G93A-Mutation keine kognitiven Defizite hervorruft, zumindest für die getesteten Tage angenommen werden.

Abweichend von den Ergebnissen an den anderen Versuchstagen sind die Werte an Versuchstag 88, an dem es größere Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppen gibt. Auffällig dabei ist, dass der Wert der Fas30-Gruppe im Vergleich zu dem vorangegangenen und dem nachfolgenden Testtag sehr niedrig ist und damit sogar eine Präferenz der Tiere für das bekannte Objekt belegt. Die FasRil30-Gruppe zeigt einen DI von circa Null, was bedeutet, dass die Mäuse keine Präferenz für ein bestimmtes Objekt zeigen.

Auf der Suche nach einer Erklärung für dieses Ergebnis ist festzuhalten, dass der Versuchsablauf für jede Gruppe und jedes Tier an den Versuchstagen gleich war, sodass dieser den Unterschied an Tag 88 nicht erklären kann. Variabel waren einzig das Alter der Tiere und die gewählten Versuchsobjekte. In der Literatur ist die Wahl der Objekte für den NOR-Test uneinheitlich und es wurden bisher viele verschiedene Objekte benutzt, welche sich in Farbe, Größe, Form und Material stark unterscheiden. Daher gibt es für die Wahl der Objekte keine klaren Empfehlungen (Antunes und Biala 2011). In diesem Experiment wurden an den verschiedenen Testtagen unterschiedliche Objekte verwendet, um mögliche Erinnerungseffekte der Mäuse an die Objekte auszuschließen (siehe Kapitel 2.7.3.). Weiterhin wurde die Position des neuen Objektes abwechselnd auf der rechten und linken Seite gewählt, um Habituationseffekte zu vermeiden.

Da die beobachtete Präferenz der Tiere für das alte Objekt an Tag 88 lediglich in der Fas30-Gruppe vorliegt, sind strukturelle Veränderungen, welche alle Versuchstiere betreffen, als Ursache eher unwahrscheinlich. Es ist jedoch festzustellen, dass das bekannte Objekt an Tag 88



mit seiner Grundfläche das größte Objekt im gesamten Versuch war und es ist anzunehmen, dass die Versuchstiere eher eine Präferenz für ein größeres Objekt zeigen. Auch nicht auszuschließen ist, dass ein Objekt aus beschichteter Pappe eventuell für die Mäuse interessanter war als ein Objekt aus Plastik oder Glas, welches an den anderen Versuchstagen verwendet wurde. Wiederum gegen diese These spricht, dass an Tag 116 eine grün-weiße Box aus Pappe als neues Objekt verwendet wurde, welche über alle Gruppen gerechnet einen niedrigeren DI-Mittelwert erreicht, als die als neues Objekt verwendete viereckige Plastikflasche an Tag 102. Außerdem zeigen die drei anderen Versuchstage konstant positive DI-Werte, unabhängig der verwendeten Objekte. Somit kann nicht von einer generellen Präferenz für ein Objekt aus Pappe ausgegangen werden.

Als weitere mögliche Ursache für die abweichenden Ergebnisse sind andere Störfaktoren, die einzelne Mäuse betreffen, eher wahrscheinlich, wie z. B. Lärm oder Geruchseinflüsse, welche trotz sorgfältiger Desinfektion der Versuchsbox nach jedem Durchgang möglich sein können. Die Mäuse zeigten sich während des Versuches sehr empfindlich gegenüber Lärm und suchten bei Geräuschen, z. B. durch ein Türschlagen im Flur neben dem Versuchsraum zumindest kurzzeitig in den Ecken der Versuchsarena Schutz. Die Analyse der potentiellen Störfaktoren „zurückgelegte Distanz“ und „Zeit ohne Bewegung“ während des Versuchs diente deshalb dazu, mögliche Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen an den verschiedenen Versuchstagen zu detektieren. Es zeigte sich, dass bezüglich dieser Variablen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe bestanden, sodass kein Anhaltspunkt für einen signifikanten Einfluss von Störfaktoren gefunden werden konnte (vgl. Abbildungen 20 und 21). Es zeigten sich an den einzelnen Testtagen bei gleichbleibender Laufstrecke allerdings signifikant unterschiedliche Zeiten, welche die Mäuse ohne Bewegung verbrachten. Die Zeit nahm von Tag 50 bis Tag 116 leicht ab. Dadurch, dass die zurückgelegte Laufstrecke konstant blieb, ist dieses Phänomen nicht durch die abnehmende motorische Leistungsfähigkeit erklärbar, sondern wahrscheinlich durch eine kontinuierliche Abnahme der Angst der Mäuse durch Habituation an den Ablauf der Testung. Während der Versuchsdurchführung war bei den jungen Mäusen an Tag 50 eine deutliche Angst vor dem Versuch spürbar und sie suchten subjektiv mehr Schutz an den Rändern der Versuchsarena als an den darauffolgenden Tagen. Diese Beobachtung lässt sich durch die Ergebnisse des Experiments bestätigen. Für weiterführende Experimente zur genaueren Beobachtung dieses Effektes wäre eine häufigere Versuchsdurchführung in der Anfangsphase sowie die Evaluation von längeren Habituations- und Versuchszeiten in der

Versuchsarena sinnvoll, um den Einfluss dieser Faktoren zu verringern. Außerdem wäre eine Studie bezüglich der generellen Präferenz von verschiedenen Versuchsobjekten sinnvoll, um in Folgeexperimenten gezielter die richtigen Objekte auswählen zu können.

Wie bereits im Einleitungsteil erwähnt, konnte auch in vorangegangenen Studien von Wicks et al. (2009) und Millecamps et al. (2010) bei ALS Patienten mit SOD1-Mutation keine Anzeichen für eine FTD oder Defizite im Erinnerungsvermögen gefunden werden. Zusammenfassend konnte auch die vorliegende Studie am SOD1-G93A-Mausmodell diese Beobachtungen bestätigen. Für die weitere Forschung zur kognitiven Leistungsfähigkeit von ALS-Patienten ist dies insofern von Bedeutung, als dass sich eine Konsistenz der Daten im Mausmodell gegenüber den Befunden von Patienten zeigt und es die bisherigen Überlegungen zum Spektrum der ALS-FTD Gene stützt.

#### **4.2. Ergebnisse der histologischen Analyse des Rückenmarks in einer Querschnittsstudie**

In der immunhistochemischen Analyse der alpha-Motoneurone in den Vorderhörnern des Rückenmarks zeigt sich wie postuliert ein signifikanter Unterschied zwischen der Kombinationsbehandlungsgruppe (FasRil30) und der Kontrollgruppe. Die eingangs formulierte Hypothese 4: „Der durch die ALS bedingte neuronale Untergang der alpha-Motoneurone im Rückenmark ist bei präsymptomatischer Behandlung mit Fasudil und Riluzol weniger stark ausgeprägt“ konnte somit bestätigt werden. Weiterhin ließen sich keine Unterschiede in der mittleren Anzahl der alpha-Motoneurone durch die Behandlung mit Riluzol oder Fasudil in Monotherapie zeigen.

Das Ergebnis des Experiments ist abgesehen von der beschriebenen Signifikanz sehr interessant, da deskriptiv kein Unterschied zwischen der Fas30-Gruppe und der Kontrollgruppe gefunden werden konnte, jedoch die Kombinationsbehandlungsgruppe deskriptiv mehr Motoneurone aufweist als die Ril30-Gruppe. Scheinbar zeigt sich durch diese Ergebnisse also eine erhoffte Synergie zwischen Fasudil und Riluzol bezüglich neuroprotektiver Effekte. Bei genauerer Betrachtung wird jedoch deutlich, dass die in Abbildung 23 erkennbaren Standardabweichungen auf Grund der geringen Versuchstierzahl in allen Gruppen so groß sind, dass eine solche Interpretation der Ergebnisse eher unwahrscheinlich ist. Dies wird darüber hinaus auch daran deutlich, dass Abbildung 23 suggeriert, dass die FasRil30-Gruppe eine höhere Anzahl von Motoneuronen aufweist als die Wildtyp-Gruppe, was physiologisch eher unwahrscheinlich ist.

Auch ein Gleichbleiben der Anzahl der Neurone wäre 20 Tage vor dem durchschnittlichen Todeszeitpunkt der Tiere sehr unwahrscheinlich.

Betrachtet man den Unterschied der Anzahl der Motoneurone der Wildtyp-Gruppe (5,97) und der Kontrollgruppe (4,35) wird deutlich, dass in der Wildtyp-Gruppe im Durchschnitt lediglich 1,5 Motoneurone pro Vorderhorn mehr vorhanden sind. Dies zeigt, dass das ganze Experiment potentiell anfällig für Ausreißer ist, und somit ein zusätzliches Motoneuron einen großen Einfluss auf das Gesamtergebnis haben kann. Wie im Methodenteil beschrieben, wurden daher pro Tier jeweils 20 Vorderhörner in 10 Querschnitten ausgezählt und der Durchschnitt gebildet. Die Standardabweichung ist trotz dieser Maßnahme in allen Gruppen groß und es ist daher davon auszugehen, dass trotz sorgfältigstem Schneiden, Färben und Auszählen der Gewebeschnitte hier eine potentielle Fehlerquelle liegen kann. In zukünftigen Experimenten sollte daher auf mehr Gewebeschnitte zurückgegriffen werden um genauere bzw. validere Ergebnisse zu erzielen.

Weiterhin fällt bei der Betrachtung der absoluten Anzahl der Motoneurone auf, dass diese in allen Gruppen deutlich geringer ist als in den Voruntersuchungen von Tönges et al. (2014). Der wahrscheinlichste Grund für diese Diskrepanz ist der Zeitpunkt der Untersuchung, welcher in diesem Experiment an d120 und in der Voruntersuchung an d100, also in einem weit früheren Stadium der Krankheit durchgeführt wurde. Die beiden Kohorten sind daher nur eingeschränkt vergleichbar. Der Grund für die spätere Untersuchung war die Annahme, dass eine Behandlung auch zu einem späteren Zeitpunkt noch zu einer höheren Anzahl von Motoneuronen führen würde. Es ist also wahrscheinlich, dass die Schwere der Krankheit gegen Ende des Experiments selbst in den behandelten Gruppen zu einem starken Verlust von Neuronen führt, sodass vorher eventuell vorhandene Gruppenunterschiede – analog zu den motorischen Ergebnissen – sich bereits wieder abschwächen. Trotzdem verbleiben in der Kombinationsbehandlungsgruppe signifikant mehr Motoneurone als in der Kontrollgruppe. Unpassend zu dieser Theorie ist jedoch die Gruppe der Wildtypen in diesem Experiment; sie weisen verglichen mit den Ergebnissen der Studie von Tönges et al. (2014) eine ungefähr halb so große Anzahl an Motoneuronen auf. Da eine Halbierung der Neurone innerhalb von 20 Tagen bei gesunden Tieren sehr unwahrscheinlich scheint, ist dieses Ergebnis nicht plausibel, aber aktuell nicht anders zu erklären. Auch in diesem Fall liegt die wahrscheinlichste Ursache in der geringen Stichprobengröße von lediglich 5 Tieren pro Gruppe.

### 4.3. Fazit und Ausblick

Das in diesem Experiment verwendete Mausmodell ist das mit Abstand am häufigsten verwendete Modell zur Simulation der ALS *in vivo*. Wie eingangs erläutert, wurde es in über 150 Behandlungsstudien verwendet (Benatar 2007). Trotz der Misserfolge von vielen Substanzen, welche zunächst vielversprechend erschienen, sind die auch am Menschen wiederholt nachgewiesenen positiven Effekte von Riluzol – und seit diesem Jahr auch Edaravone – ein Beweis für die Zweckmäßigkeit dieses Modells.

Jedoch ist zu bedenken, dass seit der Entwicklung von vor über 20 Jahren viele neue Erkenntnisse, vor allem in Bezug auf die Ätiologie und Pathogenese der ALS gewonnen wurden. Der aktuelle Wissensstand ist, dass ALS sehr heterogene genetische sowie noch unbekannte Ursachen haben kann, welche aller Wahrscheinlichkeit nach über unterschiedliche Pathomechanismen und Signalkaskaden vermittelt werden. Eine einzelne Mutation im *SOD*-Gen – von denen aktuell bereits über 100 verschiedene bekannt sind und welche die Grundlage für das verwendete Modell bildet – kann somit nur einen Teil der Erkrankung „ALS“ abbilden. Es ist daher davon auszugehen, dass ALS, analog zum Morbus Parkinson, einen Sammelbegriff für einen spezifischen klinischen Phänotyp darstellt, welcher von verschiedenen Pathomechanismen hervorgerufen wird. Beispielsweise scheinen Mutationen in den Genen *FUS* oder *TARDBP*, welche mit Veränderungen im RNA Metabolismus in Verbindung gebracht wurden, einem gänzlich anderen Pathomechanismus zu folgen als Mutationen in *SOD*.

Trotz dieser Kritikpunkte liefern die Daten aus diesem Experiment wertvolle Hinweise darauf, dass eine Kombinationsbehandlung mit Fasudil und Riluzol in der Behandlung von ALS sinnvoll sein könnte. Eine Wiederholung des Experiments mit größeren Tierzahlen bei gleichbleibender Dosis der Substanzen am *SOD*-Mausmodell erscheint daher zunächst notwendig. Auch ist der Einschluss einer weiteren Gruppe mit Fasudil 100 mg/kg Körpergewicht eine denkbare Option. Weiterhin sind die derzeit verfügbaren Tiermodelle vielfältig und schließen Modelle der Gene mit ein, welche jüngst mit ALS in Verbindung gebracht wurden (Philips und Rothstein 2015). Eine Ausdehnung der Forschung auf andere *in vivo* Modelle erscheint damit ebenfalls sehr sinnvoll und weitere Experimente hinsichtlich neuer Therapiemöglichkeiten sollten trotz des erheblichen Mehraufwands bestenfalls einen multimodalen Ansatz mit mehreren Tiermodellen verfolgen, um dem ganzen Spektrum der ALS gerecht zu werden (Schnabel 2008).

Das vielversprechende therapeutische Potenzial von Fasudil in der Behandlung von ALS wird derzeit in einer multizentrischen Phase IIa Studie an Patienten untersucht ([www.rock-als.uni-goettingen.de](http://www.rock-als.uni-goettingen.de)).

## 5. Zusammenfassung

Die Amyotrophe Lateralsklerose bleibt trotz intensivster Forschungsanstrengungen auch im 21. Jahrhundert, mehr als 150 Jahre nach ihrer Erstbeschreibung, eine der schwersten bekannten neurologischen Erkrankungen. Die Diagnose ist trotz definierter Kriterien oft langwierig und bleibt auch auf Grund des Mangels an spezifischen Biomarkern oder Untersuchungen bzw. der mit ihr verbundenen weitreichenden psychosozialen Folgen eine Ausschlussdiagnose (Brooks et al. 2009; Logroscino et al. 2010). Die Behandlung stützt sich neben einer umfangreichen symptomatischen Therapie auf das Medikament Riluzol, dessen Wirksamkeit in einer umfangreichen Metaanalyse zuletzt 2012 bestätigt wurde (Miller et al. 2012). Diese Wirksamkeit ist auf eine Verlängerung des Überlebens um zwei bis drei Monate beschränkt, was keinesfalls aus ausreichend hingenommen werden kann.

Ziel der Arbeit war es daher, an einem etablierten Tiermodell, an dem bereits über hundert Studien mit verschiedenen Versuchssubstanzen durchgeführt wurden, den Rho-Kinase-Inhibitor Fasudil in Kombination mit Riluzol auf seine günstigen Effekte zu testen und mögliche synergistische Effekte zu detektieren. Eine Verlängerung des Überlebens und eine Verbesserung der motorischen Leistungsfähigkeit von Fasudil konnte in präsymptomatischen Studien, jedoch nicht in symptomatischen Studien bereits mehrfach nachgewiesen werden (Benatar 2007; Tönges et al. 2013; Günther 2015).

In der vorliegenden Studie konnte weder für die präsymptomatische Monotherapie mit Riluzol oder Fasudil noch für eine Kombinationsbehandlung eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit im SOD1-G93A-Mausmodell gezeigt werden. Auch ein günstiger Effekt auf motorische Parameter, der bereits in vielen Studien vorbeschrieben wurde, konnte nicht repliziert werden. Wie durch die Theorie des ALS/FTD-Krankheitsspektrums erwartet, nach der die SOD1-Mutation eine hauptsächlich motorische Erkrankung verursacht, konnten in der vorliegenden Studie im Tiermodell keine Einschränkungen des Gedächtnisses der Tiere nachgewiesen werden. Eine neuroprotektive Wirkung der Kombinationsbehandlung konnte anhand von histologischen Querschnittsdaten durch eine höhere Dichte von Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks nachgewiesen werden. Eine Monotherapie mit Fasudil oder Riluzol zeigte keine signifikanten Unterschiede zu unbehandelten Tieren.

Da diese Befunde die Ergebnisse der Studien mit Riluzol am Menschen, und die wiederholt zeigten, neuroprotektiven Effekten der ROCK-Inhibition durch Fasudil nur unzureichend

reproduzieren, müssen vor allem methodische Eigenheiten des Modells und der Konzeption hier als Ursache berücksichtigt werden. Künftige Untersuchungen sollten unter anderem mit größeren Versuchsgruppen und bestenfalls mit mehreren Mausmodellen arbeiten, um das Potenzial beider Substanzen besser belegen zu können. Wichtige Hinweise für die Wirksamkeit einer Kombinationsbehandlung von Fasudil und Riluzol wird zusätzlich eine Phase-Ia-Studie liefern, welche sich derzeit in der Rekrutierungsphase befindet ([www.rock-als.uni-goettingen.de](http://www.rock-als.uni-goettingen.de)).

## 6. Literaturverzeichnis

- Abe K, Itoyama Y, Sobue G, Tsuji S, Aoki M, Doyu M, Hamada C, Kondo K, Yoneoka T, Akimoto M, et al. (2014): Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 15, 610–617
- Al-Chalabi A, Kwak S, Mehler M, Rouleau G, Siddique T, Strong M, Leigh PN (2013): Genetic and epigenetic studies of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14, 44–52
- Alves CJ, de Santana LP, Santos dos AJD, de Oliveira GP, Duobles T, Scorisa JM, Martins RS, Maximino JR, Chadi G (2011): Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res* 1394, 90–104
- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K (1996): Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271, 20246–20249
- Andersen PM (2006): Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep* 6, 37–46
- Angelov DN, Waibel S, Guntinas-Lichius O, Lenzen M, Neiss WF, Tomov TL, Yoles E, Kipnis J, Schori H, Reuter A, et al. (2003): Therapeutic vaccine for acute and chronic motor neuron diseases: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 4790–4795
- Antunes M, Biala G (2011): The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13, 93–110
- Benatar M (2007): Lost in translation: Treatment trials in the SOD1 mouse and in human ALS. *Neurobiol Dis* 26, 1–13
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V (1994): A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* 330, 585–591
- Bensimon G, Lacomblez L, Delumeau JC, Bejuit R, Truffinet P, Meininger V, Riluzole/ALS Study Group II (2002): A study of riluzole in the treatment of advanced stage or elderly patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 249, 609–615
- Borchelt DR, Lee MK, Slunt HS, Guarnieri M, Xu ZS, Wong PC, Brown RH, Price DL, Sisodia SS, Cleveland DW (1994): Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 8292–8296
- Bowling AC, Barkowski EE, McKenna-Yasek D, Sapp P, Horvitz HR, Beal MF, Brown RH (1995): Superoxide dismutase concentration and activity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 64, 2366–2369



- Brooks BR (1994): El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial „Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis“ workshop contributors. *J Neurol Sci* 124 Suppl, 96–107
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL (2009): El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1, 293–299
- Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW (1998): Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281, 1851–1854
- Bruijn LI, Miller TM, Cleveland DW (2004): Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27, 723–749
- Calvo A, Moglia C, Lunetta C, Marinou K, Ticozzi N, Ferrante GD, Scialo C, Sorarù G, Trojsi F, Conte A, et al. (2017): Factors predicting survival in ALS: a multicenter Italian study. *J Neurol* 264, 54–63
- Chen L, Liu X, Tang L, Zhang N, Fan D (2016): Long-Term Use of Riluzole Could Improve the Prognosis of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients: A Real-World Cohort Study in China. *Front Aging Neurosci* 8, 68
- Chio A (2005): Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* 128, 472–476
- Chiu AY, Zhai P, Dal Canto MC, Peters TM, Kwon YW, Prattis SM, Gurney ME (1995): Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci* 6, 349–362
- Cleveland DW, Rothstein JD (2001): From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2, 806–819
- Cleveland DW, Laing N, Hulse PV, Brown RH (1995): Toxic mutants in Charcot's sclerosis. *Nature* 378, 342–343
- Cudkowicz PME, Van den Berg LH, Shefner PJM, Mitsumoto PH, Mora JS, Ludolph PA, Hardiman PO, Bozik ME, Ingersoll EW, Archibald D, et al. (2013): Dexamipexole versus placebo for patients with amyotrophic lateral sclerosis (EMPOWER): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 12, 1059–1067
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, et al. (2011): Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245–256

- Deng H, Hentati A, Tainer J, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung W, Getzoff E, Hu P, Herzfeldt B, Roos R, et al (1993): Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261, 1047–1051
- Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD, McKerracher L (2002): Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci* 22, 6570–6577
- DGN 2014: Amyotrophe Lateralsklerose (Motoneuronenerkrankungen). S1 Leitlinie (gültig bis 31.05.2019). Hrsg. von der Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN). Abgerufen auf [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/0300011\\_Amyotrophe\\_Lateralsklerose\\_ALS\\_2015-06.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/0300011_Amyotrophe_Lateralsklerose_ALS_2015-06.pdf) am 28.01.2017
- Dupuis L, de Tapia M, René F, Lutz-Bucher B, Gordon JW, Mercken L, Pradier L, Loeffler J-P (2000): Differential Screening of Mutated SOD1 Transgenic Mice Reveals Early Up-Regulation of a Fast Axonal Transport Component in Spinal Cord Motor Neurons. *Neurobiol Dis* 7, 274–285
- Ennaceur A, Delacour J (1988): A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31, 47–59
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD (2004): Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185, 232–240
- Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2004): Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med* 10, 1055–1063
- Fuchs A, Kutterer S, Mühlhling T, Duda J, Schütz B, Liss B, Keller BU, Roeper J (2013): Selective mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake deficit in disease endstage vulnerable motoneurons of the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 591, 2723–2745
- Ganesalingam J, Stahl D, Wijesekera L, Galtrey C, Shaw CE, Leigh PN, Al-Chalabi A (2009): Latent cluster analysis of ALS phenotypes identifies prognostically differing groups. *PLoS ONE* 4, e7107
- Graf M, Ecker D, Horowski R, Kramer B, Riederer P, Gerlach M, Hager C, Ludolph AC, Kramer B, Ecker D, et al. (2004): High dose vitamin E therapy in amyotrophic lateral sclerosis as add-on therapy to riluzole: results of a placebo-controlled double-blind study. *J Neural Transm* 112, 649–660
- Guillot TS, Asress SA, Richardson JR, Glass JD, Miller GW (2008): Treadmill Gait Analysis Does Not Detect Motor Deficits in Animal Models of Parkinson's Disease or Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Mot Behav* 40, 568–577
- Gurney ME (1994): Transgenic-Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* 331, 1721–1722

- Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, Doble A, Taylor CP, Andrus PK, Hall ED (1996): Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39, 147–157
- Günther R: Pharmakologische Inhibition von Rho-Kinase im Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose. Med. Diss. Göttingen 2015
- 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, 3936
- Günther R, Balck A, Koch JC, Nientiedt T, Sereda M, Bähr M, Lingor P, Tönges L (2017): Rho Kinase Inhibition with Fasudil in the SOD1G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis—Symptomatic Treatment Potential after Disease Onset. *Front Pharmacol* 8, 90
- Hara M, Takayasu M, Watanabe K, Noda A, Takagi T, Suzuki Y, Yoshida J (2000): Protein kinase inhibition by fasudil hydrochloride promotes neurological recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurosurg* 93, 94–101
- Jacobs M, Hayakawa K, Swenson L, Bellon S, Fleming M, Taslimi P, Doran J (2005): The Structure of Dimeric ROCK I Reveals the Mechanism for Ligand Selectivity. *J Biol Chem* 281, 260–268
- Jiang R, Ai Z-S, Jiang X, Yuan P, Liu D, Zhao Q-H, He J, Wang L, Gomberg-Maitland M, Jing Z-C (2015): Intravenous fasudil improves in-hospital mortality of patients with right heart failure in severe pulmonary hypertension. *Hypertens Res* 38, 539–544
- Julien JP (2001): Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* 104, 581–591
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Velde CV, Bouchard J-P, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, et al. (2008): TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40, 572–574
- Kabashi E, Bercier V, Lissouba A, Liao M, Brustein E, Rouleau GA, Drapeau P (2011): FUS and TARDBP but not SOD1 interact in genetic models of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet* 7, e1002214
- Kioumourtoglou M-A, Rotem RS, Seals RM, Gredal O, Hansen J, Weisskopf MG (2015): Diabetes Mellitus, Obesity, and Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Population-Based Study. *JAMA Neurol* 72, 905–911
- Klivenyi P, Ferrante RJ, Matthews RT, Bogdanov MB, Klein AM, Andreassen OA, Mueller G, Wermer M, Kaddurah-Daouk R, Beal MF (1999): Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* 5, 347–350
- Knibb JA, Keren N, Kulka A, Leigh PN, Martin S, Shaw CE, Tsuda M, Al-Chalabi A (2016): A clinical tool for predicting survival in ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87, 1361–1367

- Knippenberg S, Thau N, Dengler R, Petri S (2010): Significance of behavioural tests in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Behav Brain Res* 213, 82–87
- Koch JC, Tönges L, Barski E, Michel U, Bahr M, Lingor P (2014): ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS. *Cell Death Dis* 5, e1225
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V (1996): Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* 347, 1425–1431
- Lattante S, Ciura S, Rouleau GA, Kabashi E (2015): Defining the genetic connection linking amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with frontotemporal dementia (FTD). *Trends Genet* 31, 263–273
- Ling S-C, Polymenidou M, Cleveland DW (2013): Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron* 79, 416–438
- 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
- Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio A, Mitchell D, Swingler RJ, Millul A, Benn E, Beghi E, for EURALS (2010): Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 385–390
- Ludolph AC, Bendotti C, Blaugrund E, Chio A, Greensmith L, Loeffler J-P, Mead R, Niessen HG, Petri S, Pradat P-F, et al. (2010): Guidelines for preclinical animal research in ALS/MND: A consensus meeting. *Amyotroph Lateral Scler* 11, 38–45
- Mackenzie IRA, Feldman H (2005): Ubiquitin Immunohistochemistry Suggests Classic Motor Neuron Disease, Motor Neuron Disease With Dementia, and Frontotemporal Dementia of the Motor Neuron Disease Type Represent a Clinicopathologic Spectrum. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 730–739
- Mackenzie IRA, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H, et al. (2007): Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* 61, 427–434
- Maekawa M (1999): Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895–898
- Mead RJ, Bennett EJ, Kennerley AJ, Sharp P, Sunyach C, Kasher P, Berwick J, Pettmann B, Battaglia G, Azzouz M, et al. (2011): Optimised and Rapid Pre-clinical Screening in the SOD1G93A Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *PLoS ONE* 6, e23244

- Meininger V, Bensimon G, Bradley WG, Brooks BR, Douillet P, Eisen AA, Lacomblez L, Nigel Leigh P, Robberecht W (2009): Efficacy and safety of xaliproden in amyotrophic lateral sclerosis: results of two phase III trials. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 5, 107–117
- Miana Mena FJ, Muñoz MJ, Yagüe G, Mendez M, Moreno M, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R (2009): Optimal methods to characterize the G93A mouse model of ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 6, 55–62
- Millecamps S, Salachas F, Cazeneuve C, Gordon P, Bricka B, Camuzat A, Guillot-Noel L, Russaouen O, Bruneteau G, Pradat PF, et al. (2010): SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet* 47, 554–560
- Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH (2003): Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4, 191–206
- Miller RG, Mitchell JD, Moore DH (2012): Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* CD001447
- Miyagishi H, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y (2012): Expression of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 in the Spinal Cord in a Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Pharmacol Sci* 118, 225–236
- Nagata E, Ogino M, Iwamoto K, Kitagawa Y, Iwasaki Y, Yoshii F, Ikeda J-E, ALS Consortium Investigators (2016): Bromocriptine Mesylate Attenuates Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Phase 2a, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Research in Japanese Patients. *PLoS ONE* 11, e0149509
- Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S (1996): ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett* 392, 189–193
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, et al. (2006): Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–133
- Ng J, Luo L (2004): Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. *Neuron* 44, 779–793
- Orrell R, de Belleruche J, Marklund S, Bowe F, Hallewell R (1995): A novel SOD mutant and ALS. *Nature* 374, 504–505
- Park KK, Liu K, Hu Y, Kanter JL, He Z (2010): PTEN/mTOR and axon regeneration. *Exp Neurol* 223, 45–50
- Philips T, Rothstein JD (2015): Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Protoc Pharmacol* 69, 5.67.1–21

- Pickles S, Vande Velde C (2012): Misfolded SOD1 and ALS: Zeroing in on mitochondria. *Amyotroph Lateral Scler* 13, 333–340
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, et al. (1996): Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13, 43–47
- Renton AE, Chio A, Traynor BJ (2013): State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* 17, 17–23
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng H-X, et al. (1993): Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62
- Schnabel J (2008): Neuroscience: Standard model. *Nature*, 454, 07.08.2008, 682–685
- Shi J, Wei L (2007): Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp* 55, 61–75
- Silvers JM, Harrod SB, Mactutus CF, Booze RM (2007): Automation of the novel object recognition task for use in adolescent rats. *J Neurosci Methods* 166, 99–103
- Smittkamp SE, Brown JW, Stanford JA (2008): Time-course and characterization of orolingual motor deficits in B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J mice. *Neuroscience* 151, 613–621
- Spalloni A, Geracitano R, Berretta N, Sgobio C, Bernardi G, Mercuri NB, Longone P, Ammassari-Teule M (2006): Molecular and synaptic changes in the hippocampus underlying superior spatial abilities in pre-symptomatic G93A<sup>+/+</sup> mice overexpressing the human Cu/Zn superoxide dismutase (Gly93 → ALA) mutation. *Exp Neurol* 197, 505–514
- Su F-C, Goutman SA, Chernyak S, Mukherjee B, Callaghan BC, Batterman S, Feldman EL (2016): Association of Environmental Toxins With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol* 73, 803–811
- Tafari F, Ronchi D, Magri F, Comi GP, Corti S (2015): SOD1 misplacing and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Front Cell Neurosci* 9, 479
- 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 K (2010): Do twin studies still have anything to teach us about the genetics of amyotrophic lateral sclerosis? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 1299–1300
- Talman P, Duong T, Vucic S, Mathers S, Venkatesh S, Henderson R, Rowe D, Schultz D, Edis R, Needham M, et al. (2016): Identification and outcomes of clinical phenotypes in amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease: Australian National Motor Neuron Disease observational cohort. *BMJ Open* 6, e012054

- Therrien M, Dion PA, Rouleau GA (2016): ALS: Recent Developments from Genetics Studies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 16, 59
- Tönges L, Koch J-C, Bähr M, Lingor P (2011): ROCKing Regeneration: Rho Kinase Inhibition as Molecular Target for Neurorestoration. *Front Mol Neurosci* 4, 39
- 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 K-A, Barski E, Nientied T, Götz AA, Koch J-C, et al. (2013): Rho kinase inhibition modulates microglia activation and improves survival in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 62, 217–232
- Turner MR, Hardiman O, Benatar M, Brooks BR, Chio A, de Carvalho M, Ince PG, Lin C, Miller RG, Mitsumoto H, et al. (2013): Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 12, 310–322
- Uenal H, Rosenbohm A, Kufeldt J, Weydt P, Goder K, Ludolph A, Rothenbacher D, Nagel G, ALS registry Study Group (2014): Incidence and geographical variation of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Southern Germany--completeness of the ALS registry Swabia. *PLoS ONE* 9, e93932
- Waibel S, Reuter A, Malessa S, Blaugrund E, Ludolph A (2004): Rasagiline alone and in combination with riluzole prolongs survival in an ALS mouse model. *J Neurol* 251, 1080–1084
- Watzlawick R, Sena ES, Dirnagl U, Brommer B, Kopp MA, Macleod MR, Howells DW, Schwab JM (2014): Effect and Reporting Bias of RhoA/ROCK-Blockade Intervention on Locomotor Recovery After Spinal Cord Injury. *JAMA Neurol* 71, 91
- Weydt P, Hong SY, Kliot M, Möller T (2003): Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *Neuroreport* 14, 1051–1054
- Wicks P, Abrahams S, Papps B, Al-Chalabi A, Shaw CE, Leigh PN, Goldstein LH (2009): SOD1 and cognitive dysfunction in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 256, 234–241
- Wijesekera LC, Leigh PN (2009): Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 4, 3
- Wokke J (1996): Riluzole. *Lancet* 348, 795–799
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL (1995): An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14, 1105–1116
- Wooley CM, Sher RB, Kale A, Frankel WN, Cox GA, Seburn KL (2005): Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve* 32, 43–50

Yamashita K, Kotani Y, Nakajima Y, Shimazawa M, Yoshimura S-I, 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, 215–224

Yoo Y-E, Ko C-P (2012): Dihydrotestosterone Ameliorates Degeneration in Muscle, Axons and Motoneurons and Improves Motor Function in Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Mice. *PLoS ONE* 7, e37258

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

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

Zoccolella S, Beghi E, Palagano G, Fraddosio A, Guerra V, Samarelli V, Lepore V, Simone IL, Lamberti P, Serlenga L, et al. (2007): Riluzole and amyotrophic lateral sclerosis survival: a population-based study in southern Italy. *Eur J Neurol* 14, 262–268



## Anhang

### Aus der Arbeit hervorgegangene Publikationen

Günther R, **Balck A**, Koch JC, Nientiedt T, Sereda M, Bähr M, Lingor P, Tönges L (2017): Rho Kinase Inhibition with Fasudil in the SOD1G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis - Symptomatic Treatment Potential after Disease Onset. *Front Pharmacol* 8, 90

Tönges L, Günther R, Suhr M, Jansen J, **Balck A**, Saal K-A, Barski E, Nientied T, Götz AA, Koch J-C, et al. (2013): Rho kinase inhibition modulates microglia activation and improves survival in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 62, 217–232

## **Danksagung**

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Paul Lingor und Prof. Dr. Lars Tönges für die Projektanregung, die hervorragende Betreuung von Beginn bis Ende des Projekts und den bis heute bestehenden, sehr fruchtbaren wissenschaftlichen Austausch.

Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bei Dr. René Günther bedanken. Als erfahrener Doktorand war er mir bei Fragen stets eine große Hilfe und hat keine Mühe gescheut, das Projekt in seiner Gesamtheit weiter voranzutreiben.

Darüber hinaus danke ich Elisabeth Barski und Vivian Dambeck. Beide standen mir bei der Umsetzung und der Etablierung von immunhistochemischen Färbungen immer mit gutem Rat zur Seite.