

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Neurologie
Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. med. A. C. Ludolph

Der NMDA Antagonist Neramexane
im transgenen Mausmodell mit
Amyotropher Lateralsklerose:
Effekte auf Funktion und Überleben

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von:
Kerstin Wagenfeld, geb. Hähnel
geb. in Leipzig

2012

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A.C. Ludolph

2. Berichterstatter: PD S. Liebau

Tag der Promotion: 06.12.2012

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Amyotrophe Lateralsklerose.....	1
1.2 Ätiologie.....	2
1.3 Epidemiologie.....	3
1.4 Klinischer Verlauf und Pathogenese.....	4
1.5 Prognose	5
1.6 Pathomechanismen.....	5
1.7 Neuroprotektion	9
1.8 Therapie	9
1.9 Experimentelle Tiermodelle	11
1.10 Ziel der Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Versuchstiere.....	14
2.2 Genotypisierung der Versuchstiere.....	14
2.3 Studiendesign	17
2.4 Haltungsbedingungen.....	19
2.5 Herstellung von Wirkstofflösungen.....	19
2.6 Methoden zum Nachweis der Effektivität der Wirkstoffe	21
2.7 In-vitro Untersuchungen zum Nachweis der Effektivität der Wirkstoffe	24
2.8 Statistische Auswertung	27
3 Ergebnisse.....	28
3.1 Genotypisierung der Versuchstiere.....	28

Inhaltsverzeichnis

3.2	Oraler Verbrauch an Wirkstofflösungen.....	28
3.3	Gewichtsentwicklungen im Krankheitsverlauf.....	30
3.4	Analyse der Überlebenszeit.....	31
3.4.1	Deskriptive Statistik.....	31
3.4.2	Log-Rank-Test und Kaplan-Meier-Plot.....	33
3.4.3	Kaplan-Meier-Kurve.....	34
3.5	Analyse der motorischen Laufradaktivität.....	35
3.6	Ergebnisse der Muskelkraftmessung.....	42
3.7	Histologische Untersuchung des Musculus rectus femoris.....	46
3.8	Bestimmung des durchschnittlichen Muskelfaserdurchmessers.....	47
4	Diskussion.....	49
4.1	Allgemeine Bemerkung zur Durchführung.....	49
4.2	Deskriptive Parameter.....	50
4.2.1	Trinkwasserverbrauch.....	50
4.2.2	Entwicklung des Körpergewichtes.....	50
4.2.3	Überleben.....	51
4.3	Funktionelle Parameter.....	51
4.3.1	Laufradaktivität.....	51
4.3.2	Muskelkraft.....	53
4.4	Muskelhistologie und Muskelfaserdurchmesser.....	53
4.5	Preclinical research guidelines 2010.....	54
5	Zusammenfassung.....	56
6	Literaturverzeichnis.....	58
7	Anhang.....	68
	Danksagung.....	69
	Lebenslauf.....	70

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
Abb	Abbildung
ADL	Aktivitäten des täglichen Lebens
ANOVA	Analysis of variance
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ATP	Adenosin-Triphosphat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
bzgl	bezüglich
Ca ²⁺	Calcium
cm	Zentimeter
Cra	Cramping legs
Cu/Zn	Kupfer/Zink
d	Tag
DÄ	Deutsches Ärzteblatt
dest	destilliert
dNTP	desoxy-Nucleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DGM	Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
fALS	familiäre Amyotrophe Lateralsklerose
FDA	Food Drug Administration
FTLD	frontotemporal lobar degeneration
Fr	Freitag
g	Gramm
G93A	Glycin 93 Alanin
GABA	Gamma-aminobutyric acid
ggf.	gegebenenfalls

Abkürzungsverzeichnis

Glu	Glutamat
GST	Grip Strength Test
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin & Eosin
hSOD	humane Superoxiddismutase
K⁺	Kalium
kg	Kilogramm
l	Liter
Loa	Legs at odd angles
LC	lower confidence intervall (unteres Konfidenzintervall)
NaOH	Natriumhydroxid
M	Molar
Mo	Montag
Mg²⁺	Magnesium
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MW	Mittelwert
mIl-2	murines Interleukin-2
mg	Milligramm
Mi	Mittwoch
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	Anzahl
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
NaOH	Natriumhydroxid
NT	Neurotransmitter
o.g.	oben genannte
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Ketten Reaktion)
PEG	perkutane endoskopische Gastrostomie
pmol	Picomol
pH	pH-Wert

Abkürzungsverzeichnis

RT	reverse Transkriptase
sec.	Sekunde
sALS	sporadische Amyotrophe Lateralsklerose
SD	Standardabweichung
SOD	Superoxid-Dismutase
sog.	sogenannt
UC	oberer Konfidenzintervall (upper confidence interval)
Up	Umdrehungen pro
V	Volt
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die Amyotrophe Lateralsklerose

Bekannt ist die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) seit mehr als 100 Jahren: federführend in der Krankheitsbeschreibung gilt der französische Neurologe Jean-Martin Charcot. Er dokumentierte Symptome, fertigte histologische Präparate an, machte Aussagen zu pathogenetischen Entitäten und untersuchte in Ansätzen den Krankheitsverlauf. Eine vollständige Untersuchung des Krankheitsverlaufs war oft nicht möglich, aufgrund der Unkenntnis über das hohe Manifestationsalter bei eher niedriger Lebenserwartung. Letztlich liefert Charcot bedeutungsvolle Beschreibungen der ALS mit nachhaltiger Wirksamkeit (Ludolph et al, 2000).

Sie lässt sich heute anhand des klinischen Erscheinungsbildes, histologischen sowie elektrophysiologischen Untersuchungen als degenerative Motoneuronenerkrankung diagnostizieren. In jüngster Zeit kann auf validierte Forschungsergebnisse zurückgegriffen werden, dass erst die Kombination aus klinischem Verlauf und neurophysiologischer Diagnostik eine präzise Aussage zur Krankheit möglich macht (Körner, 2010).

Überwiegend wird ein allmählicher Kraftverlust der willkürlichen Muskulatur beobachtet (zur Hauptsache unilateral der oberer Extremität). Syndromal kann sich ALS auch in der sog. bulbären Form äußern. Hier sind Sprach-, Schluck- Kaufunktion zunehmend beeinträchtigt, wohingegen Sensibilität, kognitive Fähigkeit, Hören, Riechen, Schmecken, Sehen, - Blasen- und Mastdarmfunktion funktionell uneingeschränkt bleiben. In Ergänzung mit typischen elektromyo- und neurografischen Mustern, sowie serologischen, histologischen und auch radiologischen Parametern kann die ALS eng von anderen neuromuskulären Erkrankungen abgegrenzt werden.

Was letztlich zum Ausbruch der Krankheit führt und welche Ursachen zu Grunde liegen ist nur teilweise bekannt. Weltweite Studien, die sich um einer kausale Erklärung der ALS bemühen, wenden sich von dem mono-kausalen Gedanken ab und betrachten die ALS als eine multifaktorielle Erkrankung.

1.2 Ätiologie

Die Amyotrophe Lateralsklerose tritt in 90% der Fälle als sporadische Form (sALS) auf. 10 % der Patienten zeigen eine positive Familienanamnese (fALS). Davon tragen ein Fünftel der Betroffenen eine Mutation (G93A) im Gen für das Enzym Cu/Zn Superoxid Dismutase 1 (SOD1) (Rosen, 1993). Bei dieser Mutation kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Alanin an Position 93. Insgesamt wurden mittlerweile mehr als 90 Mutationen in der humanen Cu/Zn-SOD identifiziert, die mit der ALS assoziiert sind, beispielsweise G37R, G59S, G86R (Gaudette, 2000).

Bei mehr als 80% der fALS-Patienten ist die Mutation noch nicht bekannt. Bei über 90% der Betroffenen treten keine weiteren Fälle innerhalb der Familie auf (sALS), so dass die sporadische Form wahrscheinlich durch ein komplexes Zusammenspiel von Umweltfaktoren und zahlreichen genetischen Loci entsteht, die jeweils einzeln nur geringen Einfluss ausüben. (Dunkley et al, 2007). Van Damme hält einen Zusammenhang zwischen Mutationen im SOD1-Gen und der sporadischen Form der ALS für wahrscheinlich (Van Damme, 2005). Weitere Überlegungen zur Ätiopathogenese sind der Einfluss durch Umweltfaktoren, die virale/infektiöse Genese, Autoimmunerkrankungen, exogene und endogene Neurotoxine sowie auf molekularer Ebene Apoptose, Beeinträchtigungen im axonalen Transport und Exzitotoxizität (Almer 2003, Ludolph et al, 2000). Es gibt eine Vielzahl von Hypothesen, die sich meist um wenig belegte Befunde ranken. Beispielsweise suggeriert das Phänomen der sog. „Golfkrieg-ALS“, wonach die Inzidenz um den Faktor 4 bei den zurückgekehrten Soldaten anstieg, ein infektiöses/ umweltbedingtes Agens (Barohn und Rowland, 2002). Auf der Insel Guam im Westpazifik wurde eine enorme Häufung der Erkrankten gefunden (Almer, 2003). Anfänglich wurde eine exzitatorische AS, die in einer als Nahrungsmittelgrundlage dienenden Palmenart vorkommt, verantwortlich gemacht. Bemerkenswerterweise trat in Guam die ALS Symptomatik nicht isoliert auf, sondern in Form des ALS/PD-Komplex (Parkinson-Dementia-Komplex). Neben nicht bestätigten Vermutungen hier einen genetischen Hintergrund erkennen zu können, werden bisher nicht erfasste Umweltfaktoren (z.B. Schwermetalle) oder eine infektiöse Genese (Neurotoxine) angenommen (Garruto et al, 1984). Eisen und Calne belegten in ihrer Studie die signifikant höhere Inzidenz von anderen neurodegenerativen Erkrankungen innerhalb der Familien mit ALS-Betroffenen (Eisen und Calne, 1992). Weitere DNA Mutationen bei Patienten mit fALS wurden in den, auf verschiedenen Chromosomen lokalisierten, Alsin- und Angiogeninen gefunden.

Im Jahr 2003 wurde das Auftreten von Motoneuronenerkrankungen im Zusammenhang mit einer Mutation (G59S) im axonalen Transportprotein Dynaktin beschrieben (Puls, 2003). Als

großer Fortschritt der aktuellen ALS-Forschung gilt die Entdeckung, dass Mutationen in den, im Zellkern lokalisierten, DNA/RNA-bindenden Proteinen TDP-43 (TAR DNA binding protein 43) und FUS (Fused-In-Sarcoma) im Zusammenhang stehen bezüglich dem Auftreten von ALS und der frontotemporalen Demenz (FTLD) (Dormann und Haas, 2011). Bereits 2006 beschrieb Neumann das Auftreten von hyperphosphoryliertem TDP-43 in Hirnregionen bei Patienten mit ALS und frontotemporaler Demenz (Neumann, 2006). In 5% aller familiären ALS-Fälle wurden Mutationen in der FUS- und TDP-43-DNA als krankheitsverursachend identifiziert (Mackenzie et al, 2010). Histopathologisch lassen sich bei den betroffenen Patienten ubiquitinierte TDP-43 bzw. FUS-Einschlüsse im Zytoplasma der Nervenzellen nachweisen (Mackenzie et al, 2007). Mit diesem Befund einhergehend kommt es zu einem Verlust von TDP-43 bzw. FUS im Zellkern. Interessanterweise finden sich abnormale zytoplasmatische TDP-43 Einschlüsse nicht nur bei den familiären ALS-Patienten, sondern auch bei 90% aller sporadischen ALS-Fälle sowie vielen anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Demenz vom Alzheimer Typ und der Huntington Erkrankung (Josephs, 2008; Schwab, 2008). Das Protein TDP-43 ist intrazellulär bei allen Patienten mit ALS nachweisbar, jedoch nicht bei Mutationsträgern der Cu/Zn SOD (Mackenzie et al, 2007). Abnormale zytoplasmatische FUS- Einschlüsse finden sich hingegen nur bei wenigen ALS-Patienten. Hier bestehen interessante Parallelen zur SOD1 assoziierten ALS, die ebenfalls durch abnorme Proteinablagerungen innerhalb des Motoneurons charakterisiert sind (Sau et al 2007; Blair, 2010). Dabei ist von Interesse, welche pathologischen Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede zwischen Mutationen der SOD1, TDP-43 und FUS bestehen.

1.3 Epidemiologie

Die Amyotrophe Lateralsklerose ist die häufigste degenerative Erkrankung des motorischen Nervensystems des Erwachsenen (Brooks, 1996). In Deutschland sind etwa 6000 Menschen an der kombinierten Degeneration des ersten und zweiten Motoneurons erkrankt. ALS tritt am häufigsten zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr, zur Hauptsache jedoch ab dem 50. Lebensjahr, auf. 1985 beschrieb Gubbay eine unterste Altersgrenze von 20 Jahren (Gubbay, 1985). Regelmäßig erkranken auch Patienten, die zwischen 20 und 30 Jahre alt sind. (Dengler und Ludolph, 2000). Die Inzidenz nimmt mit dem Alter zu und ist in ihrer geografischen und ethnischen Verteilung weitgehend konstant (Almer, 2003). Der weltweite Durchschnittswert

der ALS-Inzidenz beträgt 1,5 – 2,6 / 100.000 Einwohner pro Jahr, der Durchschnittswert der ALS-Prävalenz 1,5 – 8,5 / 100.000 Einwohner (Brooks, 1996).

1.4 Klinischer Verlauf und Pathogenese

Die spinale Form verursacht ein duales Auftreten von schlaffer und spastischer Parese. Charakterisiert ist die spastische Parese durch eine axonale Degeneration von Neuronen im motorischen Kortex (sog. Betz-Riesenzellen). Ursächlich für die schlaffe Parese ist eine, in den Vorderhörnern des Rückenmarkes bedingte, Degeneration von Motoneuronen, zur Hauptsache auf dem zervikalen und lumbalen Niveau. Mehr als 50% des Motoneuronenpools müssen funktionell ausgefallen sein, bevor leichtere bzw. unvollständige Lähmungserscheinungen (Paresen) und eindeutige klinische Zeichen zusammentreffen. Die kollaterale Reinnervation kann den Verlust von bis zu 50% der motorischen Einheiten eines Muskels kompensieren.

Frühzeitige Symptome sind Muskelschwäche, Faszikulationen der Zungenmuskulatur und eine gestörte Feinmotorik. Hier ist der Beginn an den oberen oder unteren Extremitäten variabel. Die Atrophien entwickeln sich vorwiegend distal an den Extremitäten und zwar zu 50% an den Armen und zu 50% einseitig. Im Verlauf der Erkrankung breiten sich die Paresen mit remissionsloser Progredienz auf alle Muskelgruppen aus - bis hin zur Tetraplegie. Die Bulbär-Zeichen treten genau dann auf, wenn der Krankheitsprozess sich auf die motorischen Hirnnerven (V, VII, IX, X, XI, XII) im unteren Hirnstammbereich ausweitet. Zu ihnen gehören Dysarthrie, Aphonie, Schluckstörungen und Zungenatrophie mit den erwähnten Faszikulationen. Die bulbäre Form bedingt bei 25% der Patienten die initiale Symptomatik.

Sind ausschließlich supranukleäre Neurone betroffen, also die Bahnen, die die Hirnnervenkerne zwischen Großhirn und Stammganglien verbinden, so gilt die Bezeichnung Pseudobulbärparalyse. Es stehen klinisch pathologisches Lachen und Weinen, Affektlabilität und Pyramidenbahnzeichen im Vordergrund. Die glatte Muskulatur ist nicht betroffen, so dass Blasen- und Mastdarmfunktion uneingeschränkt bleiben. Sowohl die geistige Aktivität als auch die Sensibilität bleiben bis zum Eintreten der letalen Ateminsuffizienz im gewohnten Umfang erhalten.

1.5 Prognose

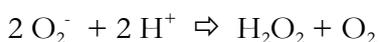
Die Erkrankung verläuft progredient und führt in 3 – 5 Jahren zum Tod. Die mittlere Überlebenszeit unterscheidet sich jedoch bei den verschiedenen Verlaufsformen der ALS. Bei der extremitätenbetonten Variante beträgt sie 3,3 Jahre, bei Patienten mit einer anfänglich bulbären Symptomatik oder einer Mitbeteiligung der Atemmuskulatur 2 – 2,5 Jahre. (Jokelainen, 1977). Todesursache ist bei allen Varianten in der Regel eine zunehmende respiratorische Insuffizienz (Wiestler, 1994), die Prognose damit infaust.

1.6 Pathomechanismen

Die Amyotrophe Lateralsklerose gilt heute als eine multifaktorielle Erkrankung eines komplexen Zusammenspiels genetischer und molekularer Faktoren (Kiernan et al, 2011). Zahlreiche Pathomechanismen werden vielseitig diskutiert; u.a. gelten oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktionen (Dupuis et al, 2004) als ebenso wahrscheinlich wie Pathologien im axonalen Transport (Bruijn, 2004) oder Störungen im Energiemetabolismus (Dupuis et al, 2011). Im Zusammenhang mit der TDP-43/FUS-Pathologie bei der ALS werden u.a. Defekte nukleärer Importsysteme diskutiert (Dormann und Haass, 2011).

1.6.1 Genetische Faktoren und oxidativer Stress

Im Jahr 1993 stellte die Entdeckung, dass ein Teil der fALS-Patienten (20%) eine Mutation G93A) im Gen für das Enzym Cu/Zn Superoxid Dismutase 1 aufweist, einen neuen Forschungsansatz dar (Rosen et al, 1993). So stellt die Mutation im SOD1-Gen die häufigste Genveränderung in der familiären ALS dar (Deng et al, 1993). Bei dem Enzym Cu/Zn SOD1 handelt es sich um einen Radikalfänger, der die Umwandlung von Superoxid-Radikalen in nicht-toxische Stoffwechselprodukte katalysiert. Es entspricht dies dem Wasserstoffperoxid und dem molekularem Sauerstoff.



Superoxid ist eine chemisch selektive und reaktive Sauerstoff-Spezies. Sie entsteht in allen aeroben Zellen und wirkt bei zu hohen intrazellulären Konzentrationen zerstörend (Valentine und Hart, 2003). Gurney konnte experimentell zeigen, dass die Krankheit nicht durch eine

Einleitung

Senkung der SOD-Aktivität verursacht, sondern dass die Gegenwart des mutierten Cu/Zn SOD Polypeptids selbst toxisch für Motoneuronen ist (Gurney et al, 1994; Gurney, 2000).

Da die Mutation in der SOD1 die normale Funktion nicht beeinträchtigt, also den o.g. biochemischen Schritt problemlos ausführt, wird vermutet, dass das mutierte Enzym eine unbekannte Funktion hinzugewinnt („gain of function“) (Reaume et al, 1996; Valentine und Hart, 2003).

Untersuchungen zeigen ein Absterben von Motoneuronen, bedingt durch die mutierte Form der humanen Cu/Zn SOD1. Sowohl beim Menschen als auch in dem transgenen Tiermodell führt sie zu einer oxidativen Schädigung der Mitochondrien. Im Mausmodell verändern sich große Neurone im Vorderhorn des Rückenmarkes durch Ausbildung von Mikrovesikulationen, hervorgerufen durch degenerierte Mitochondrien. Die mitochondriale Dysfunktion hängt eng mit oxidativem Stress zusammen. Bei mitochondrialer Dysfunktion kommt es zu einem Energiemangel, welcher zu zellulärem Stress führt. Ausgangsprodukt der Atmungskette ist Sauerstoff, der komplett zu Wasser reduziert wird. Das Mitochondrium ist somit auch dem schädlichen Potential des Sauerstoffs in besonderem Maße ausgesetzt. So führt nicht nur eine mitochondriale Dysfunktion zu oxidativem Stress, sondern auch umgekehrt oxidativer Stress zu mitochondrialer Dysfunktion.

So beschreiben Dal Canto and Gurney erste zellstrukturelle Zeichen der Erkrankung (Dal Canto et al, 1994). Bis heute konnte jedoch der exakte Pathomechanismus der SOD-vermittelten Toxizität nicht aufgeklärt werden (Almer, 2003).

In den übrigen 80% der Fälle der fALS ist eine Reihe von Mutationen bekannt, die sowohl autosomal dominant oder rezessiv vererbt werden (Kunst, 2004). Dabei sind Mutationen an Proteinen in den Fokus gerückt, die für den axonalen Transport verantwortlich sind. Das ist daher so bedeutend, da das menschliche Axon eines Motoneurons bis zu 100cm lang werden kann und einen intakten axonalen Transport bedingt.

Eine Schlüsselrolle des axonalen Transportes stellt das kodierende DCTN-1 Gen für Dynaktin mit seiner wichtigen Untergruppe p150 dar (Holzbaur et al, 1996). Dynaktin ist aktiv an der Neuronenauswanderung und Chromosomenausrichtung während der Mitose beteiligt, ist jedoch selbst nicht in der Lage zelluläre Bestandteile zu binden, sondern fungiert als Bindungspartner für Motorproteine (Gaglio et al, 1997). Erst im Zusammenspiel mit Dynein ist ein korrekter retrograder Transport von Vesikeln und Organellen möglich. Puls et al konnten in ihrer Studie zeigen, dass eine Mutation im DCTN-1 Gen z.B. zu einer langsam progredienten autosomal-dominanten Motoneuronenerkrankung führen kann (Puls et al, 2003;

Puls et al, 2005). Hierbei liegt z.B. eine Mutation (G59S) in der p150 Untereinheit des Dynaktin-Komplexes vor.

1.6.2 NMDA Rezeptor und Exzitotoxizität

Ein weiterer Überlegungsansatz ist die durch Glutamat-vermittelte exzitatorische Erregung an Neuronen und konsekutiv die neuronale Degeneration. Neurone oder Gliazellen des zentralen Nervensystems (ZNS) sind in der Lage mittels spezifischer Enzyme Neurotransmitter (NT) zu synthetisieren. Diese sind entscheidend an der Signaltransduktion zwischen den Synapsen im ZNS beteiligt. Als NT fungieren neben biogenen Aminen, wie Acetylcholin oder Katecholamine, verschiedene Peptide (z.B. Substanz P) und Gase, hauptsächlich aber neuronal aktive, modulierende Aminosäuren (AS) - beispielsweise GABA, Glycin, L-Glutamin- und L-Asparaginsäure. Das physiologisch wirksame Anion Glutamat (Glu) ist der wichtigste exzitatorische NT im zentralen Nervensystem des Menschen. Nahezu 50% aller Neurone im Gehirn des Menschen werden durch Glu moduliert (Snyder und Ferris, 2000). L-Glutamat bindet hauptsächlich postsynaptisch an verschiedenen Glutamat-Rezeptoren, speziell hier an den NMDA-Rezeptor (N-methyl-D-aspartat-Rezeptor) (Lynch und Guttman, 2001). Der N-methyl-D-aspartat (NMDA) Rezeptor selbst ist ein ionotroper Glutamat-Rezeptor und kommt vor allem im Zentralnervensystem (Hippocampus, Großhirn) vor. Allerdings konnten in letzter Zeit in vielen peripheren, nicht-neuronalen Geweben Glutamat-Rezeptoren nachgewiesen werden (Stark, 2001).

Der Glutamat-Rezeptor zeichnet sich durch eine hohe Permeabilität für Na^+ , K^+ - und Ca^{2+} -Ionen aus und gehört zu den ligandengesteuerten Kationenkanälen (Köles, 2001). Glutamat sorgt für eine moderate Signaltransduktion mit länger anhaltender Rezeptorantwort. So kann der NMDA Rezeptor über den Calciumeinstrom verschiedene second messenger - Systeme aktivieren, die allerdings bei Überaktivierung zytotoxisch (Exzitotoxizität) wirken können (Lynch und Guttman 2002). Damit ist der NMDA Rezeptor an einer Reihe von pathologischen Zuständen beteiligt, zu denen neuronaler Zelltod und Degeneration gehören. 1971 fasste J.W. Olney die neurotoxischen Eigenschaften, die exzitatorische Aminosäuren aufweisen, wenn sie durch pathophysiologische Prozesse im Übermaß freigesetzt werden, unter dem Begriff Exzitotoxizität zusammen (Gagliardi, 2000). Durch einen übermäßigen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle werden zahlreiche Prozesse ausgelöst, die unter bestimmten Bedingungen zytotoxisch wirken können. Die Freisetzung von Glutamat führt zur Aktivierung

Einleitung

von nicht-NMDA Rezeptoren und somit zur Depolarisierung der Zellmembran. Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle werden aktiviert, die Mg^{2+} -Blockade vom NMDA Rezeptor löst sich. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glycin kommt es zur Rezeptoraktivierung. Die Folge ist der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle mit Konzentrationserhöhung des intrazellulären Calciums. Er kann somit als second messenger zahlreiche enzymatische Reaktionen in der Zelle aktivieren. Durch die Überstimulierung kommt es zur Schädigung der Mitochondrien.

Bis heute ist nicht in allen Einzelheiten geklärt, wie der Ca^{2+} -Einstrom eine neuronale Zellschädigung auslösen kann, jedoch existieren mehrere mögliche Mechanismen. So kann der massive Einstrom von Ca^{2+} Ionen verschiedene Enzyme, wie Lipasen, Phospholipasen, Proteasen, Endonucleasen etc. aktivieren, deren Interaktionen sich schädlich auf die Zellhomöostase auswirken. Zusätzlich kann eine mitochondriale Dysfunktion aufgrund einer vermehrten Ca^{2+} -Aufnahme in die Mitochondrien und damit verbundener Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies, zu dem exzitatorischen Zelltod beitragen (Urushitani et al, 2001). Der daraus resultierende starke Abfall des ATP-Spiegels in den Zellen führt zur Apoptose und Nekrose in den betroffenen Neuronen. Als akute Erkrankung in Folge von Exzitotoxizität sind vor allem Schlaganfall und Schädel-Hirn-Trauma zu nennen (Arundine und Tymianski, 2004). Die Amyotrophe Lateralsklerose gilt als vorbildliches Beispiel der chronischen Erkrankungen mit vermuteter oben genannter Pathophysiologie.

Dabei gilt der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter Glutamat als Schlüsselsubstanz im Verständnis einer möglichen Pathogenese. Glutamat stellt den überwiegenden Anteil an erregenden (exzitatorischen) AS dar und liegt in einer relativ hohen Konzentration im ZNS vor (Stark, 2000 Teil 1). Die Rezeptorlokalisierung ist im ZNS und im Rückenmark ubiquitär mit auffälligen Verteilungszonen im Hippocampus und Zerebralcortex (Stark, 2000).

1.7 Neuroprotektion

Unter Neuroprotektion versteht man der Versuch Nervenzellen und Nervenfasern durch pharmakologische oder molekularbiologische Methoden vor dem Absterben zu bewahren. Ziel der Neuroprotektion ist es, die zugrundeliegende Ätiologie oder Pathogenese einer Erkrankung günstig zu beeinflussen und dadurch den Erkrankungsbeginn, Symptomatik oder den klinischen Verlauf zu verzögern (Schwarz J, 2001; Ravina 2003). Als neuroprotektiv wirkende Substanz zur Behandlung der ALS wird derzeit das Medikament Rilutek eingesetzt. Der Wirkstoff Riluzol greift an mehreren Stellen in Prozesse der Signalübertragung mit dem Botenstoff Glutamat ein. Zum einen wird die Glutamatfreisetzung reduziert und zu anderen die glutamatvermittelte Aktivierung von Glutamatrezeptoren vermindert. Damit wirkt Riluzol den exzitotoxischen Effekten entgegen.

1.8 Therapie

1.8.1 Symptomatischer Therapieansatz

Eine kurative Therapie ist derzeit nicht bekannt, deswegen liegt heutzutage der Fokus der Patientenversorgung in einer optimalen palliativmedizinischen und interdisziplinären Versorgung. Die Erhaltung autonomer und kognitiver Funktionen, als auch Ängste und depressiven Störungen zu mindern, ist beispielhaft für lebensqualitätssteigernde Maßnahmen (Borasio, 1998). Die Anlage einer perkutanen endoskopische Gastrostomie (PEG) vermindert nicht nur die Aspirationsgefahr, sondern zögert bei den oft quälenden Schluckstörungen, insuffizienter Kaumuskulatur eine Malnutrition hinaus (Mazzini, 1995). Bezüglich der Muskelschwäche sollten rechtzeitig Hilfsmittel bereitgestellt werden, um die Selbständigkeit in den Aktivitäten des täglichen Lebens (ADL) so lange als möglich zu erhalten.

Die respiratorische Insuffizienz gilt als limitierender Faktor. Eine nichtinvasive Heimbeatmung verbessert die Lebensqualität, gilt lebensverlängernd (Lulè, 2008). Dadurch äußern die Patienten weniger Ängste bzgl. des Erstickens, der Nachtschlaf verbessert sich, die Tagesmüdigkeit wird verringert, die kognitive Leistung steigt an. (Aboussouan 1997; Schlamp, 1998 und Newsom-Davis, 2001).

1.8.2 Medikamentöser Therapieansatz

1.8.2.1 Riluzol

In einer Reihe von Studien wurden mehr als 50 potentiell wirksame Substanzen ohne wesentlichen Erfolg getestet (Mitsumoto 1995). Im Jahr 1996 beschrieben Doble et al. einen komplexen Wirkmechanismus des Glutamatantagonisten Riluzol, dem derzeit einzigen zugelassenen Medikament mit signifikantem Nachweis von positiven Studienergebnissen (Nirmalanathan, 2005).

Unter der Annahme, dass Glutamat im Überschuss krankhaft wirkt, wurde der Glutamatantagonist Riluzol entwickelt. In zwei großen, unabhängig placebokontrollierten Studien konnte ein positiver Effekt auf die Verzögerung des Krankheitsverlaufes, als auch verlängerte Überlebenszeit gezeigt werden. (Lacomblez 1996, Bensimon 1994). Schließlich wurde 1996 Riluzol (Rilutek[®]) in Deutschland als bisher einziges ALS Medikament zugelassen. Riviere konnte 1998 zeigen, dass ein früherer Einsatz des Medikaments zu einem langsameren Verfall der motorischen Funktionen führt (Riviere et al, 1998). Die Therapie führt lediglich zu einer Verlängerung der Überlebenszeit um drei bis vier Monate bei einer durchschnittlichen Restlebenserwartung von 18 Monate (Miller, 1996; Miller , 2003).

1.8.2.2 Neramexane

Bei Neramexane handelt es sich um die chemische Weiterentwicklung von Memantine (durch die Food Drug Administration [FDA] bereits als Antidementivum zugelassen). Es ist eine Substanz, die zur Behandlung der Demenz vom Alzheimer-Typ eingesetzt wird. Memantine reguliert die Wirkung pathologisch erhöhter toxischer Konzentrationen von Glutamat, die zu einer neuronalen Funktionsstörung führen können. Neramexane gehört zu den niedrig affinen Glutamat-Rezeptorantagonisten und beeinflusst die neuronale Erregbarkeit durch antiglutamatergen Wirkansatz (Rammes, 2006).

Neramexane ist ein spannungsabhängiger, oral applizierbarer und nicht-kompetitiver Antagonist des NMDA-Rezeptors.

Neramexane wurde in verschiedene Studien aufgrund seiner neuroprotektiven Komponente als klinisch wirksame Substanz untersucht (Danysz, 2002). Vielversprechend sind die Einsatzmöglichkeiten zum Beispiel bei der Alzheimer-Demenz (Rammes, 2006), Drogenabhängigkeit (Kotlinska, 2004) und analgetischen Therapie (Klein, 2008). Auf der Suche nach Substanzen mit einer verbesserten Wirksamkeit als Riluzol, jedoch unter

Beibehaltung des antiglutamergen Wirkprinzips sollte die Substanz Neramexane, im Auftrag der Firma Merz Pharmaceuticals, Deutschland, in einer präklinischen Studie hinsichtlich ihrer Wirksamkeit im ALS-Mausmodell getestet werden.

1.9 Experimentelle Tiermodelle

In der biomedizinischen Forschung werden Tiermodelle zur Aufklärung von Pathomechanismen und zur Entwicklung von Medikamenten verwendet. Bei Tiermodellen handelt es sich meist um gentechnisch veränderte Mäuse oder Ratten, die z.B. ein humanes mutiertes Protein überexprimieren und in Folge Symptome der entsprechenden humanen Erkrankung entwickeln. Das am häufigsten verwendete und am besten charakterisierte ALS-Mausmodell ist die transgene *high copy* SOD1^(G93A)-Maus (Gurney et al, 1994). Seit diesem Zeitpunkt existiert ein genetisch definierter Modellorganismus an dem die Pathogenese und eine mögliche Therapie der ALS systematisch untersucht werden können (Dal Canto, 1994; Gurney et al, 1994).

Obwohl die Übertragbarkeit der Ergebnisse insbesondere der präklinischen Studien auf den Menschen oft nur unzureichend ist (Benatar, 2007) hat sich das SOD^{G93A}-Mausmodell in der wissenschaftlichen Forschung zur Untersuchung relevanter Pathomechanismen bei der ALS als sehr hilfreich erwiesen (Vargas et al, 2011). Neben dem SOD1^(G93A)-Mausmodell existieren weitere ALS-Mausmodelle mit anderen humanen SOD Mutationen (Gaudette, 2000). Ein neues Mausmodell für die Amyotrophe Lateralsklerose wird durch die transgene Dynaktin (G59S)-Maus repräsentiert (Laird et al, 2008). Mausmodelle mit Mutationen im FUS- bzw. TDP-43-Gen werden derzeit entwickelt und charakterisiert (Wils et al, 2010; Wegorzewska et al, 2009).

1.9.1 Das *SOD1^{G93A}*-Mausmodell der ALS

1994 wurde ein transgenes Mausmodell (*SOD1*/+) entwickelt, das die mutierte Form (*G93A*) des humanen Cu/Zn *SOD1* Proteins überexprimiert. Das *SOD^{G93A}*-Mausmodell mit hoher Kopienanzahl verkörpert einen Phänotyp wie er bei ALS Patienten gesehen wird. Es ist seit über 20 Jahren in der ALS Grundlagenforschung etabliert und wurde daher auch für diese Arbeit verwendet.

Die *high copy SOD^{G93A}*-Maus trägt 18 Kopien des mutierten humanen *SOD1*-Gens, das durch einen Aminosäureaustausch von Glycin zu Alanin an Position 93 gekennzeichnet ist. Die Tiere entwickeln im Alter von ca. 90 Tagen die klinischen und neuropathologischen Charakteristika einer selektiven Vorderhorndegeneration, ähnlich der ALS. (Gurney et al, 1994). Die ersten ultrastrukturellen Krankheitsanzeichen im ALS-Mausmodell sind eine extensive Mikrovesikulation großer Neurone im Vorderhirn des Rückenmarks, die offensichtlich von degenerierenden Mitochondrien hervorgerufen werden (Dal Canto und Gurney, 1994). Die *SOD1^{G93A}*-Tiere weisen keinen neuronalen Zelluntergang im Motorkortex auf, die Erkrankung ist im Tiermodell primär spinal lokalisiert (Almer, 2003). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die mutierte Form der humanen Cu/Zn *SOD*, sowohl beim Menschen als auch in dem transgenen Mausmodell zu einer oxidativen Schädigung der Mitochondrien und nachfolgend zum Absterben der Motoneurone bei der ALS führt (Mattiuzzi et al., 2002). Die transgenen ALS-Mäuse zeigen den Phänotyp einer Erkrankung des motorischen Systems, gekennzeichnet durch eine abnormale Spreizung der Hintergliedmaßen, Tremor und Muskelschwäche beginnend im Alter von 90 Tagen. 10-15 Tage vor dem Beginn des Endstadiums der Erkrankung entwickeln die Tiere eine Lähmung der Hintergliedmaßen (Gurney et al., 1994) Die Tiere erreichen das Endstadium der Erkrankung im Alter von ca. 130 Tagen (Heiman-Patterson et al, 2005). Mit Hilfe des *SOD^{G93A}*-Mausmodells werden sowohl Effekte von neuen pharmakologischen Substanzen, als auch Pathomechanismen der ALS erforscht. Allerdings ist die Reproduzierbarkeit und die Übertragung der Ergebnisse präklinischer Studien auf den Menschen limitiert (Ludolph, 2010).

1.10 Ziel der Arbeit

Die amyotrophe Lateralsklerose ist eine degenerative Erkrankung der zentralen Motoneurone mit infauster Prognose. Es gibt derzeit keinen kurativen Ansatz, jedoch konnte eine prolongierte Lebenserwartung durch das Medikament Rilutek erreicht werden. Der beinhaltete Wirkstoff Riluzol greift via neuroprotektiver Mechanismen in die glutamatvermittelte Rezeptorantwort ein. Der NMDA Rezeptorantagonist Memantine zeigt bei anderen degenerativen Erkrankungen, wie z. Bsp. der Alzheimer-Demenz, positive Wirkungen durch die Interaktion im Glutamathaushalt. Neramexane ist eine chemische Weiterentwicklung des bereits zugelassenen Wirkstoffs Memantine und wird zur Hauptsache als neues Pharmakon in der Tinnitus-Behandlung eingesetzt. Die Pathophysiologie lässt jedoch auch andere positive Effekte vermuten, so dass Neramexane als NMDA Rezeptorantagonist im G93A Mausmodell der ALS untersucht wurde. In Anlehnung an publizierte Daten bezüglich Überlebensdauer, Muskelkraft und histologischen Effekten durch Riluzol ist die Untersuchung mit Neramexane an diesen Parametern noch offen.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der potentiell neuroprotektiven Wirkung des nichtkompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten Neramexane auf den Krankheitsverlauf der transgenen SOD^{G93A}-Tiere. Die protektive Wirkung wurde anhand der folgenden Parameter evaluiert: Bestimmung der Überlebenszeit (Zeit bis zum Erreichen des Endstadiums) und Untersuchung von Muskelkraft, Körpergewicht und motorischer Aktivität im Krankheitsverlauf. Post mortem wurde die Morphologie der Muskelzellen evaluiert und der Muskelfaserdurchmesser des Musculus quadriceps femoris bestimmt. Daneben wurden die experimentell erhobenen Parameter geschlechterspezifisch verglichen, was letztlich zu einer möglichen neuen Zielformulierung in weiteren Untersuchungen führen kann. Obwohl unbehandelte transgene Tiere keinen signifikanten Unterschied im Überleben zeigen, wurde hier der positive behandlungsspezifische Einfluss auf die Geschlechter deutlich. Die männlichen und weiblichen Tiere reagierten different auf verschiedene medikamentöse Einflüsse.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 *Das transgene SOD1^{G93A} – Mausmodell der ALS*

Für die vorliegende Arbeit wurden transgene *high copy* Mäuse des Stammes B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J verwendet. Die Zuchttiere wurden über die Firma The Jackson Laboratories, Bar Harbor (USA) bezogen. In der Tierforschungsanlage der Universität Ulm wurden männliche transgene B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J –Tiere mit weiblichen B6SJLF1/J Tieren verpaart. 21 Tage nach der Geburt wurden die Jungtiere, nach Geschlecht getrennt, abgesetzt. Die Tiere erhielten Ohrmarkierungen und es wurde eine Schwanzbiopsie zur Genotypisierung genommen. Für die Studie wurden ausschließlich transgene Tiere der Filialgeneration F1 verwendet.

2.2 Genotypisierung der Versuchstiere

2.2.1 *DNA – Isolierung*

Zur Bestimmung des Genotyps der Tiere wurde genomische DNA aus ca. 5 mm Schwanzbiopsiematerial der Jungtiere isoliert. Dazu wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Isolation der genomischen DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Untersuchung bei 4°C gelagert.

2.2.2 *Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)*

Die Genotypisierung der transgenen SOD1^{G93A}-Tiere erfolgte mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Bei der PCR handelt es sich um eine *in vitro* Methode, welche sich die Eigenschaft von DNA-Polymerasen zunutze macht um eine Vervielfältigung bzw. Amplifikation von Nukleinsäuren zu erreichen (Saiki et al., 1998). Zur Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Fragments verwendet man zwei Oligonukleotide, sog. Primer, die zu den

Enden des zu amplifizierenden DNA-Fragments jeweils komplementär sind und in gegenläufiger Richtung an den komplementären DNA-Strang binden. Nach einer Hitzedenaturierung werden die Primer an die einzelsträngige DNA angelagert (Annealing) und von einer hitzebeständigen DNA-Polymerase verlängert (Elongation). Dieser Zyklus (Denaturierung, Annealing, Elongation) wird bis zu 35mal wiederholt. Die in jedem Zyklus entstehenden Fragmente dienen im Folgezyklus als Matrize. So findet eine exponentielle Amplifikation statt. Essentiell für diese Reaktion ist eine hitzestabile Polymerase, da die Denaturierung der DNA-Templates bei 94°C stattfindet. In aller Regel wird die Taq-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus* verwendet.

2.2.3 Bestimmung des Genotyps der SOD1^{G93A} – Tiere

Die Genotypisierung der Nachzucht erfolgte mittels einer Multiplex-PCR.; das bedeutet, dass in einem PCR-Ansatz mit Hilfe von zwei spezifische, Primerpaaren (Thermo Electron, Ulm). zwei unterschiedliche DNA-Fragmente vervielfältigt werden. Das eine Primerpaar amplifiziert ein ca. 320 bp großes Fragment der endogenen murinen Interleukin 2 (mIL-2) DNA. Das mIL-2 Fragment dient dabei als positiv Kontrolle, da das Gen sowohl bei den transgenen-, als auch Wildtyp-Tieren vorkommt. Das andere Primerpaar amplifiziert einen ca. 250 bp großen DNA-Abschnitt, spezifisch für die humane mutierte SOD1(G93A) und dient damit der Identifizierung der transgenen Tiere, die in der Studie verwendet werden. Die nachfolgende Tabelle 1 zeigt die Basenabfolge der beiden verwendeten Primerpaare.

Tabelle 1: Primersequenz für die Genotypisierung der SOD1^{G93A}-Tiere

Primer	Sequenz
mIL2-sense	5`-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3`
mIL2-antisense	5`-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATC-3`
hSOD1 ^{G93A} -sense	5`-CATCAGCCCTAATCCATCTGA-3`
hSOD1 ^{G93A} -antisense	5`-CGCGACTAACAATCAAAGTGA-3`

Das Reaktionsvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 50 µl. Die PCR wurde mit dem „Recombinant Taq DNA Polymerase“ Set der Firma Invitrogen durchgeführt. Die Firma Amersham Biosciences stellte die dNTPs zur Verfügung. Mittels „GeneRuler™ 100bp DNA Ladder“ der Firma Fermentas erfolgte der Größenvergleich der amplifizierten Banden. Im Nachfolgenden sind die Angaben zum Reaktionsansatz dargestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Protokoll für den Ansatz einer SOD1-PCR

Reagenzien	Mengenangaben
DNA (aus Mäuseschwänze isoliert)	0,5 ng
Primer IL – 2 sense	20 pmol
Primer IL – 2 antisense	20 pmol
Primer SOD1 sense	20 pmol
Primer SOD1 antisense	20 pmol
MgCl ₂	0,075 µmol
PCR – Puffer	1x
dNTPs	0,04 µmol
Taq – Polymerase	2,5 U

Die Ansätze wurden in einen Thermocycler (Trio Thermoblock, Firma Biometra) gegeben und folgendes PCR – Temperaturprogramm gewählt (Tabelle 3):

Tabelle 3: PCR Programm für die SOD PCR

Reihenfolge	Temperatur [°C]	Dauer in [min]	Bemerkung
1. Schritt	95	5	
2. Schritt	95	1	
3. Schritt	60	1	
4. Schritt	72	1	30 Zyklen; Schritte 2 – 4
5. Schritt	72	10	
6. Schritt	4	unendlich	

2.2.4 Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, mit der DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden können. DNA-Moleküle wandern als negativ geladene Nukleinsäuren in einer Agarose Matrix in Richtung des positiven Pols, der Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe, Konformation, Polarisierung und von der Ladungsstärke des Moleküls abhängt. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der zwischen die einzelnen Basen des DNA-Doppelstrangs interkaliert und bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht von 254 nm oder 300 nm Wellenlänge rot-orange fluoresziert. Die Nachweisgrenze von ethidiumbromidgefärbten Gelen liegt bei 5 ng je Bande (Muehlhardt, 1999). Zur Herstellung der verwendeten 2%igen Agarosegele wurde Agarose (Neo Ultra, Fa. Roth) in 1x TAE-Puffer (0,04 M TrisAcetat; 1 mM EDTA pH 8,0) eingewogen und in einem Mikrowellengerät (AEG) bis zur vollständigen Lösung der Agarose erhitzt. Nach Abkühlung auf 60°C wurden 7µl Ethidiumbromid - Lösung (10 mg/ml) pro 100 ml Agarose-Lösung hinzugefügt und das Gel luftblasenfrei in einen Gelschlitten (Maße 7cm x 7 cm) gegossen und ein Kamm mit 5 Probestaschen eingesetzt. Das erstarrte Gel wurde in eine mit 1x TAE-gefüllte Elektrophoresekammer (Mini Sub Cell Elektrophorese-System, BioRad) gegeben.

10 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl 10x DNA-Ladepuffer (40 mg Bromphenolblau und 5 ml Glycerin in 15 ml Aqua dest, mit 0.5 M EDTA auf pH = 8 eingestellt) versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Zur Identifikation der amplifizierten DNA-Fragmentgrößen wurde ein DNA-Längenstandard (GeneRuler™, 100 bp DNA Ladder, Fermentas) mitgeführt. Die angelegte Spannung betrug 80 V. Zur Auswertung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde das Geldokumentationssystem Gel Doc 1000 (Bio-Rad) verwendet.

2.3 Studiendesign

Die präklinische Studie wurde in Kooperation mit der Firma Merz Pharmaceuticals GmbH, Deutschland, durchgeführt. Die Studie umfasste vier Behandlungsgruppen. Die Substanz Neramexane wurde geschlechtsspezifisch dosiert und sowohl einzeln als auch in Kombination mit dem Wirkstoff Riluzol oral appliziert. Als Positivkontrolle dienten Riluzol-behandelte Tiere. Die Tiere der Negativkontrolle erhielten Wasser. Basis für die Fallzahlplanung der

Studie war die Erwartung unterschiedlicher Überlebenszeiten zwischen behandelten und nicht-behandelten SOD^{G93A}-Tieren im Vergleich zu unbehandelten SOD^{G93A}-Tieren (Gurney et al, 1989). Dem Ergebnis der Fallzahlplanung entsprechend wurden 22 Tiere (11 männliche und 11 weibliche Tiere) pro experimenteller Gruppe und zusätzlich 2 Ersatztiere beantragt und genehmigt. Die Gesamttieranzahl betrug 96 Tiere. Die Durchführung der präklinischen Studie erfolgte gemäß des, vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigten, Tierversuchsantrags Reg.-Nr. 853.

Im Alter von 30 Tagen wurden die Tiere zufällig den einzelnen Behandlungsgruppen zugeordnet und einzeln in Haltungskäfige, die jeweils mit einem Laufrad ausgestattet waren, gesetzt. Die Dosierung der Wirkstofflösungen begann im Alter von 45 Tagen und endete an dem Tag an dem die Tiere das Endstadium erreichten. Aus Tierschutzgründen werden die Tiere mit Erreichen des Endstadiums getötet, das lt. Tierversuchsantrag wie folgt definiert ist: Die Tiere haben das Endstadium erreicht, sobald sie nicht mehr in der Lage sind sich unverzüglich aufzurichten, nachdem sie auf die Seite gelegt wurden. Die Tötung der Tiere erfolgte mittels zervikaler Dislokation.

Die experimentellen Gruppen (n=24) setzten sich wie folgt zusammen:

Gruppe 1 – Negativkontrolle

Gruppe 1a (weibliche Tiere): Trinkwasser ad libitum, ohne Wirkstoffzusatz

Gruppe 1b (männliche Tiere): Trinkwasser ad libitum, ohne Wirkstoffzusatz

Gruppe 2 – Positivkontrolle

Gruppe 2a (weibliche Tiere): Tägliche orale Gabe von Riluzol (35mg/kg Tag) im Trinkwasser ad libitum, ab Tag 45 bis zum Erreichen des Endstadiums

Gruppe 2b (männliche Tiere): Tägliche orale Gabe von Riluzol (35mg/kg Tag) im Trinkwasser ad libitum, ab Tag 45 bis zum Erreichen des Endstadiums

Gruppe 3 - Einzelwirkstoff

Gruppe 3a (weibliche Tiere): Tägliche orale Gabe von Neramexane (150mg/kg Tag) im Trinkwasser ad libitum, ab Tag 45 bis zum Erreichen des Endstadiums

Gruppe 3b (männliche Tiere): Tägliche orale Gabe von Neramexane (50mg/kg Tag) im Trinkwasser ad libitum, ab Tag 45 bis zum Erreichen des Endstadiums

Gruppe 4 - Kombinationswirkstoffe

Gruppe 4a (weibliche Tiere): Tägliche orale Gabe von Neramexane (150mg/kg Tag) im Trinkwasser ad libitum,, ab Tag 45 bis zum Erreichen des Endstadiums **plus** tägliche orale Gabe von Riluzol (35mg/kg Tag) im Trinkwasser ad libitum, ab Tag 45 bis zum Erreichen des Endstadiums

Gruppe 4b (männliche Tiere): Tägliche orale Gabe von Neramexane (50mg/kg Tag) im Trinkwasser ad libitum, ab Tag 45 bis zum Erreichen des Endstadiums **plus** tägliche orale Gabe von Riluzol (35mg/kg Tag) im Trinkwasser ad libitum, ab Tag 45 bis zum Erreichen des Endstadiums

2.4 Haltungsbedingungen

Bei den Haltungskäfigen handelt es sich um Makrolon-Käfigen (26,5cm x 20cm x 14cm), die mit Weichholzgranulat als Einstreu ausgestattet waren. Die Tiere hatten Wasser und das Maus-/ Rattenzuchtfutter (SSniff MZ Ereich) ad libitum zur Verfügung. Die Wasserflaschen mit und ohne Wirkstoff sowie die Käfige wurden 1 x pro Woche gewechselt. Die Raumtemperatur betrug $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, die Luftfeuchtigkeit $80\% \pm 10\%$. Automatische Regelung der Lichtperiode betrug 13,5 Stunden, die der Dunkelperiode 10,5 Stunden.

2.5 Herstellung von Wirkstofflösungen

Die Applikation der Wirkstoffe Neramexane und Riluzol erfolgte oral in Trinkwasserflaschen. Beide Substanzen standen initial in pulverisierter Form zur Verfügung und wurden für die orale Applikation in entkalktem Leitungswasser gelöst. Die zu applizierende Dosis von Neramexane wurde von der Firma Merz Pharmaceuticals vorgegeben. Aufgrund der geschlechtsabhängigen Pharmakokinetik von Neramexane erfolgte die Dosierung geschlechtsspezifisch. Die Trinkflaschen wurden 1x pro Woche erneuert; und mit frisch angesetzter Wirkstofflösung gefüllt. Für die korrekte Dosierung wurde ein mittlerer Trinkwasserverbrauch von 6 ml/24 h pro Maus und ein durchschnittliches Gewicht von 19 g (weibliches Tier) bzw. 24 g (männliches Tier) zu Grunde gelegt. Die Dosierung von Riluzol

erfolgte nach Literaturangaben (Gurney et al, 1998). Die Wirkstofflösungen standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Zur Einwaage der Wirkstoffe wurde eine Präzisionswaage (Feinwaage Adventurer™ AR 0640, Fa. Ohaus) verwendet.

2.5.1 Kontrollgruppe Trinkwasser

Entkalktes, mit HCL angesäuertes Leitungswasser (pH 3.0) stand den Tieren der „Kontrollgruppe Trinkwasser“ *ad libitum* zur Verfügung. Die Trinkflaschen und das Leitungswasser wurden 1x pro Woche erneuert.

2.5.2 Riluzol

Eine Dosierung von 35 mg/kg Tag Riluzol diente in der Studie als Positivkontrolle. 500 ml entkalktes Wasser wurden mit 100 ml 1M HCL versetzt. Bei Erreichen eines pH-Wertes von pH 2 (pH-Meter 526 wtw, MultiCal™) wurden 0,135 g Riluzol zugesetzt und über Nacht durch stetes Rühren (Ikamag™ RH, Janke & Kunkel) vollständig gelöst. Durch Zugabe von 6M NaOH-Lösung wurde pH 5 eingestellt. Das Gemisch wurde mit entkalktem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml in lichtundurchlässige Flaschen aufgefüllt. Die Endkonzentration der Riluzol-Lösung betrug 0,135 mg/ml (135mg/L) und ist bei 4°C für ca. 2 Monate stabil.

2.5.3 Neramexane

2.5.3.1 Weibliche Tiere

Die Dosierung der weiblichen Tiere mit Neramexane lag bei 150 mg/kg Tag. 0,48g Neramexane wurden in 500ml entkalktem Wasser gelöst. Durch Zugabe von 0.1M NaOH wurde der pH auf 5 eingestellt. Die Lösung wurde mit entkalktem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml aufgefüllt und in lichtundurchlässige Flaschen abgefüllt. Endkonzentration 480mg/L. Die Lösung ist bei Raumtemperatur ca. 2 Wochen stabil.

2.5.3.2 *Männliche Tiere*

Die Dosierung der männlichen Tiere mit Neramexane lag bei 50 mg/kg Tag.

0,2g Neramexane wurden in 500ml entkalktem Wasser gelöst. Durch Zugabe von 0.1M NaOH wurde der pH auf 5 eingestellt. Die Lösung wurde mit entkalktem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml aufgefüllt und in lichtundurchlässige Flaschen abgefüllt. Endkonzentration 200 mg/L. Die Lösung ist bei Raumtemperatur ca. 2 Wochen stabil.

2.5.4 *Kombinationslösung Neramexane plus Riluzol*

2.5.4.1 *Weibliche Tiere*

Die Dosierung der weiblichen Tiere lag bei 150 mg/kg Tag Neramexane und 35 mg/kg Tag Riluzol. Die Riluzollösung wird wie unter Punkt 4.5.2 beschrieben hergestellt. Dann werden zu 1 L Riluzol 0,48g Neramexane eingewogen. Der pH Wert wird überprüft und gegebenenfalls auf pH 5 eingestellt.

2.5.4.2 *Männliche Tiere*

Die Dosierung männlichen Tiere lag bei 50 mg/kg Tag Neramexane und 35 mg/kg Tag Riluzol. Die Riluzollösung wurde wie unter Punkt 4.5.2 beschrieben hergestellt. Dann wurden zu 1 L Riluzol 0,2g Neramexane eingewogen. Der pH Wert wurde überprüft und gegebenenfalls auf pH 5 eingestellt.

2.6 **Methoden zum Nachweis der Effektivität der Wirkstoffe**

2.6.1 *Bestimmung des Trinkwasserverbrauchs*

Der Trinkwasserverbrauch der Tiere wurde stichprobenartig bei allen Behandlungsgruppen, 1x pro Woche an n=10 Tieren während der gesamten Behandlungsdauer überprüft. Die Auswertung erfolgte sowohl geschlechtsspezifisch als auch für beide Geschlechter zusammen. Es wurde für jede Behandlungsgruppe der mittlere Trinkwasser-Verbrauch (ml/Tag) \pm SD bestimmt und graphisch dargestellt.

2.6.2 Bestimmung des Körpergewichtes

Das Gewicht aller Tiere wurde 1x pro Woche bestimmt (Diätwaage, Beurer). Dazu wurden die Tiere am Schwanz aus dem Käfig genommen und in ein hohes Gefäß gesetzt. Es wurde für jede Behandlungsgruppe das mittlere Körpergewicht (g/Woche) berechnet und graphisch dargestellt.

2.6.3 Bestimmung der Überlebenszeit

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der applizierten Wirkstoffe wurde die Lebensspanne der Tiere bestimmt. Da die Tiere Symptome entwickeln, die denen der humanen ALS sehr ähnlich sind, würden die Tiere, ohne Euthanasie, an respiratorischer Insuffizienz versterben. Aus Gründen des Tierschutzes wurden die Tiere daher getötet sobald sie das Endstadium der Erkrankung erreicht hatten. Das Endstadium ist wie folgt definiert: „Die Tiere haben das Endstadium erreicht sobald sich nicht mehr in der Lage sind sich unverzüglich aufzurichten, nachdem sie auf die Seite gelegt wurden“. In einer ersten deskriptiven Analyse wurden die Parameter Normalverteilung, Mittelwert, Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum ermittelt und tabellarisch dargestellt. Die statistische Auswertung der Überlebenszeiten erfolgte mittels Log-rank-Test, die grafische Darstellung mittels Kaplan-Meier-Plot (SPSS™, Sigma Plot Version 9.0 und Sigma Stat. 3.1.). Als Grundlage der Analyse von Überlebenszeiten dient der Beobachtungszeitraum (=Geburt bis Tod).

2.6.4 Bestimmung der Laufradaktivität

Im Alter von 38 Tagen wurden die Tiere, einzeln, in standardisierte Käfige, die mit einem Laufrad und Nahrung/Flüssigkeit ad libitum ausgestattet sind, gesetzt. Die Aktivitätsmessung im Laufrad erfolgt bei den nachtaktiven Tieren von 18 Uhr bis 6 Uhr. In den ersten Wochen stieg die Aktivität der Tiere aufgrund einer Lern- und Eingewöhnungsphase stetig an bis sie ein konstantes Niveau erreichte. Daher wurde die Laufradaktivität der ersten drei Wochen nicht für die Auswertung herangezogen. Aufgrund zum Teil großer individueller Unterschiede bei der Laufradaktivität wurden bei der Auswertung die täglich erfassten Werte wochenweise zusammengefasst. Danach wurde die durchschnittliche Laufradaktivität aller Tiere pro Gruppe

berechnet. Da die männlichen und weiblichen Tiere unterschiedlich aktiv sind, erfolgt eine geschlechtsspezifische Auswertung.

Zur Beurteilung der motorischen Aktivität im Krankheitsverlauf wurde ein sigmoidales Regressions-Modell (Hill) mit der folgenden Formel angewendet.

$$y = \frac{ax^b}{x^b + c^b}$$

y = Laufradaktivität (Anzahl der Umdrehungen/12h)

x = Alter der Tiere (Wochen)

a = Präsymptomatische Laufradaktivität (waagerechte Asymptote)

b = Krankheitsverlauf (Steigung)

c = Tag der halbmaximalen Laufradaktivität (Wendepunkt)

Der Parameter a spiegelt die Laufradaktivität vor der symptomalen Phase der Erkrankung wider. Der Parameter b gibt an wie schnell die Krankheit verläuft und über den Parameter c lässt sich der Tag ermitteln, an dem die maximale Aktivität der Tiere um 50% reduziert ist.

Die berechneten Hill-Parameter a, b und c wurden mit den entsprechenden Parametern der Trinkwasser Kontrollgruppe mittels Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. Für zwei-Gruppen Vergleiche wurde der t-test verwendet.

2.6.5 Messung der Muskelkraft

Die Messung der Muskelkraft wurde mit Hilfe des Grip-Strength-Meßgerätes GST (Bioseb, Chaville; France) durchgeführt. Dabei wurde die Stärke des Haltevermögens der Maus auf einem Gitter gemessen. Das Drahtgitter hatte eine Größe von 8cm x 8cm und war mit einem isometrischen Kraftmesser verbunden. Zur Messung der Kraft der Vordergliedmaßen wurde die Maus am Schwanz gehalten und von oben so auf das Gitter gesetzt, dass sie sich nur mit den Vorderpfoten festhalten konnte. Der Körper wurde möglichst waagrecht gehalten und gleichmäßig nach hinten über die komplette Länge des Gitters gezogen (Abbildung 1). Wenn die Tiere das Gitter los ließen war die maximale Griffstärke erreicht. Zur Messung der Kraft

der Hintergliedmaßen wurde die Prozedur mit allen vier Pfoten auf dem Gitter wiederholt und die Werte der Muskelkraftmessung der Vordergliedmaßen wurden subtrahiert. Es wurden drei Einzelmessungen pro Tier durchgeführt und daraus der Mittelwert gebildet. Die Messungen wurden 3x pro Woche an n= 5 Tieren pro Behandlungsgruppe durchgeführt und begannen im Alter von 100 Tagen. Die Messungen endeten kurz bevor die Tiere das Endstadium erreicht hatten. Die Daten wurden geschlechtsspezifisch ausgewertet. Die graphische Darstellung erfolgte mittels Boxplot. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test verwendet, Software Programm GraphPad Prism 5.04.



Abbildung 1: Durchführung der Muskelkraftmessung der Vordergliedmaßen

2.7 In-vitro Untersuchungen zum Nachweis der Effektivität der Wirkstoffe

2.7.1 *Histologische Untersuchungen des Musculus quadriceps femoris*

2.7.1.1 *Muskelpräparation*

Am Versuchsende wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet, der Musculus quadriceps femoris präpariert und auf einen Papierstreifen gelegt. Danach wurde der Muskel stufenweise eingefroren. Im ersten Schritt erfolgte das Einfrieren bei ca. -96°C in vorgekühltem 2-Methylbutan (Merck). Nach 2 min wurden die Präparate mit einer kalten Pinzette aus dem Becherglas entnommen und auf Trockeneis gelegt. Anschließend erfolgte die Aufbewahrung im Gefrierschrank bei -80°C .

Die histologischen Feinschnitte wurden bei -21°C in einem Kryostaten der Firma Leica, Modell CM 3050 S angefertigt. Zur Herstellung der Schnitte mit einer Dicke von $10\mu\text{m}$ wurden die Muskeln mit Tissue Tek[®] (Fa. Sakura, Zoeterwoude, NL) auf der Gewebhalterung fixiert. Nach dem Angleich der Gewebetemperatur wurden bei manueller

Schnittfolge ca. 10 Muskelquerschnitte auf einem Objektträger (SuperFrost®Plus Objektträger, Fa. Menzel GmbH & Co KG) abgelegt. Die fertigen Objektträger wurden bis zum Anfertigen der Hämatoxylin & Eosin (HE) - Färbung bei -80°C aufbewahrt.

Pro Maus wurde ein Muskel präpariert. Auf jeden Objektträger wurden sechs Muskelquerschnitte aufgezogen. Insgesamt wurden fünf Objektträger pro Muskel mit Muskelquerschnitten belegt.

Pro Behandlungsgruppe wurden fünf Tiere bzw. Muskel präpariert und geschnitten.

2.7.1.2 *Hämatoxylin & Eosin (HE) Färbung*

Nach der Entnahme der Schnitte aus dem Gefrierschrank (Temperatur -80°C) wurden die Objektträger zum Trocknen unter den Abzug gelegt. Alle Objektträger mit aufgezogenen Muskelquerschnitten wurden nach einem Standardprotokoll gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte zunächst für 10 min in einer wässrigen 4 % Formalin-Lösung (37%-ig Formalin; Merck) fixiert. Nach kurzem Spülen in Leitungswasser wurden die Objektträger für zwei min in Aqua dest. überführt und daraufhin für die Kernfärbung fünf Minuten in frisch filtriertem Hämalaun (Mayers Hämalaun; Merck) inkubiert. Danach wurden die Schnitte kurz in 0,75%igem Salzsäure-Alkohol (Merck) differenziert und anschließend für zehn Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut. Nach erneutem Spülen in Aqua dest. erfolgte die Zytoplasmafärbung für 15 min in Eosin (Eosin Lösung 0,5% wässrig; Roth). Nach weiterem Spülen der Schnitte in Aqua dest. wurden diese in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 30 sec. in 70% Ethanol, 80% Ethanol, 96% Ethanol, 2x100% Ethanol, je 10 min 2x100% Xylol (Merck)) entwässert und mit Entellan (Merck) eingebettet.

2.7.1.3 *Befundung der histologischen Muskelschnitte*

Die gefärbten Schnitte wurden mit dem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung (Fa. Olympus, Modell BX51TF) analysiert und fotografiert (Fa. Olympus, Soft Imaging System CC12) und befundet (Fa. Olympus, cellF, Version 2.5). Bei der Befundung der Muskelschnitte wurden Form und Größe der Muskelfaser (eine Muskelfaser entspricht einer Muskelzelle mit

mehreren Zellkernen), die Beschaffenheit der Septen, das Aussehen und die Stellung des Zellkerns.

2.7.1.4 Quantifizierung der Muskelfaserdurchmesser

Die aufgenommenen Bilder der HE gefärbten Muskelschnitte wurden morphometrisch ausgewertet. Zur Bestimmung des Zelldurchmessers wurde der größte Querschnitt, der orthogonal auf dem absolut größten Zellquerschnitt steht, gemessen (Abbildung 2). Der Bildausschnitt zur Vermessung der Zellquerschnitte wurde dabei zufällig ausgewählt. Es wurden alle, in den gewählten Bildausschnitten gelegenen Muskelfasern vermessen; die minimale Anzahl von 100 Muskelfasern, die ein Bildausschnitt enthalten muss, darf jedoch nicht unterschritten werden. (Dubowitz und Sewry, 2007).

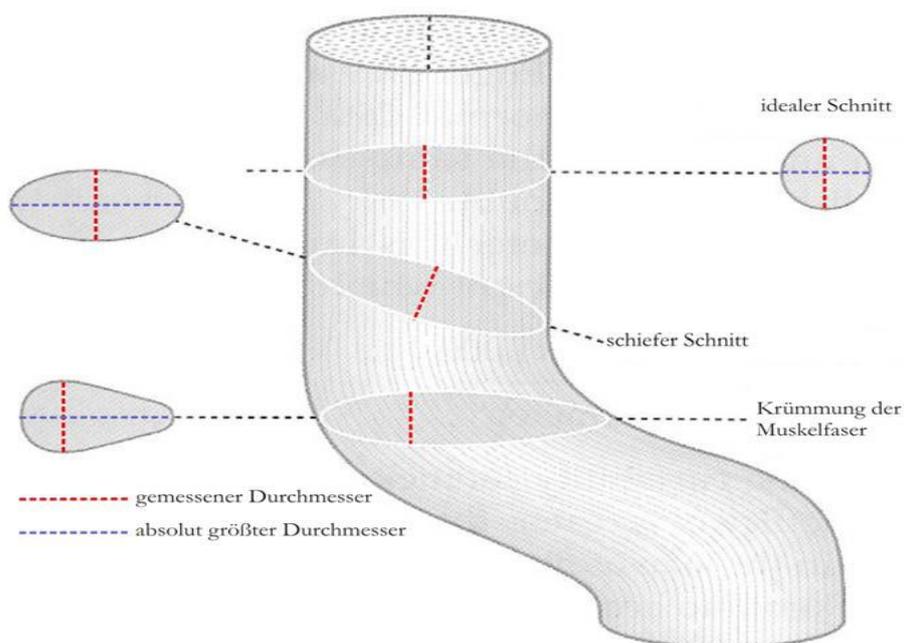


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Muskelfaser. Dabei ist mit der roten Linie der gemessene Querschnitt und der blauen Linie der absolut größte Querschnitt der Muskelfaser markiert. Als Beispiele für die verschiedenen Orientierungsmöglichkeiten, sind ein idealer und ein schiefer Schnitt, sowie ein Schnitt einer gekrümmten Muskelfaser eingezeichnet. (verändert nach Dubowitz und Sewry, 2007).

2.8 Statistische Auswertung

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte über die Software SPSS™ (Sigma Plot Version 9.0 und Sigma Stat 3.1.). Die verwendeten statistischen Tests waren neben deskriptiver Statistik zu Feststellung von linearen Zusammenhängen die statistische Auswertung zweier Gruppen durch den zweiseitigen, ungepaarten t-test. Für multiple Gruppenvergleiche erfolgte die statistische Auswertung mittels ANOVA-Datenanalyse mit Bonferroni-Korrektur. Nach statistischen Unterschieden zwischen den Gruppen wurde mit dem nichtparametrischen H-Test nach Kruskal und Wallis gesucht. Die dabei gefundenen Unterschiede wurden anschließend mittels Wilcoxon-Test ermittelt. Bei allen statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0,05$ als Signifikanzniveau festgelegt.

Im Ergebnisteil werden die verwendeten Tests gesondert genannt.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Abbildung 3 zeigt das Ergebnis der Genotypisierung der Jungtiere. Bei allen Tieren ist das ca. 320 bp große DNA-Fragment des endogenen murinen IL-2 Genfragments erkennbar. Als transgen wird eine Maus bezeichnet, wenn zusätzlich zu der IL-2 Bande, das ca. 230 bp großes DNA-Fragment der humanen mutierten SOD^{G93A} auf dem Agarosegel erkennbar ist. Als Wildtyp-Mäuse werden Tiere bezeichnet, bei denen nur die IL-2 Bande erkennbar ist. In der Studie wurden nur transgene Tiere eingesetzt.

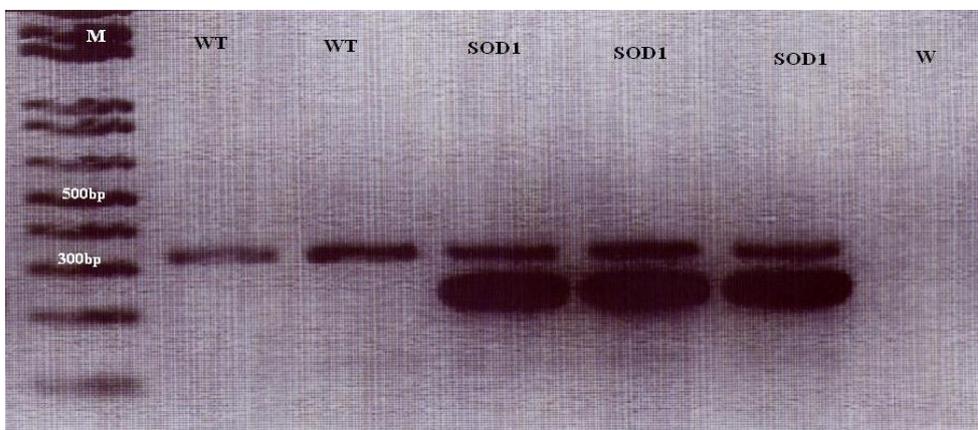


Abbildung 3: Ergebnis der Genotypisierung auf einem 2%igen Agarosegel. M: Längenstandard (GeneRuler™, 100 bp DNA Ladder), WT: Wildtyp-Tier, SOD1: transgenes SOD1^{G93A}-Tier W: Negativ-Kontrolle

3.2 Oraler Verbrauch an Wirkstofflösungen

Der tatsächliche Verbrauch der Wirkstofflösungen steht in Übereinstimmung mit dem zu Grunde gelegten Trinkwasserverbrauch von 6ml/24h. Es gab keinen Hinweis auf Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Eine dreifach höhere Konzentration von Neramexane im Trinkwasser bei den weiblichen Tieren hatte keinen Einfluss auf den Trinkwasserverbrauch. Es wird deutlich, dass der Trinkwasserverbrauch im Krankheitsverlauf abnimmt.

Tabelle 4: Oraler Verbrauch an Wirkstofflösungen – männliche transgene Mäuse

Alter (Woche)	Verbrauch an Wirkstofflösungen - männliche Tiere					
	Riluzol 35 mg/kg d		Neramexane 50 mg/kg d		Neramexane + Riluzol 50 mg/kg d + 35 mg/kg d	
	n = 5		n = 5		n = 5	
	(ml/d)	SD	(ml/d)	SD	(ml/d)	SD
7	6,72	0,757	7,64	0,521	7,27	0,930
8	7,14	0,763	7,09	1,272	6,60	0,616
9	6,20	1,664	6,88	1,617	6,24	0,890
10	6,09	1,240	7,86	1,233	7,06	2,442
11	6,86	1,407	7,43	0,589	6,86	1,385
12	6,46	1,423	6,43	0,707	6,63	0,697
13	5,94	1,210	6,34	1,154	6,91	1,062
14	5,97	1,027	6,54	1,131	6,46	1,136
15	6,37	1,541	4,95	0,886	6,34	0,793
16	5,76	1,728	4,95	0,858	6,04	1,392
17	5,19	1,033	4,98	0,874	6,21	0,831
18	5,98	2,039	5,82	0,960	5,09	0,569
19	4,14		7,75		7,29	1,616
20						

n: Anzahl der untersuchten Tiere, SD: Standardabweichung, d: Tag

Tabelle 5: Oraler Verbrauch an Wirkstofflösungen – weibliche transgene Mäuse

Alter (Woche)	Verbrauch an Wirkstofflösungen - weibliche Tiere					
	Riluzol 35 mg/kg d		Neramexane 150 mg/kg d		Neramexane + Riluzol 150 mg/kg d + 35 mg/kg d	
	n = 5		n = 5		n = 5	
	(ml/d)	SD	(ml/d)	SD	(ml/d)	SD
7	6,60	0,279	5,83	0,500	5,90	0,526
8	6,11	0,186	6,61	1,434	5,43	1,063
9	6,20	0,653	6,39	1,868	7,14	2,728
10	5,69	0,421	6,03	1,080	7,83	1,960
11	6,74	0,987	6,31	1,858	7,49	1,480
12	6,49	0,577	6,29	0,226	6,63	0,540
13	6,17	0,665	5,66	0,998	6,40	0,519
14	5,54	0,456	6,49	0,521	6,80	0,531
15	6,00	1,079	7,29	2,887	6,83	1,486
16	5,75	0,950	5,66	0,611	6,29	0,881
17	4,76	0,950	4,70	1,680	6,14	0,617
18	6,83	0,236	6,18	1,770	7,25	1,801
19			4,36	0,101	5,00	0,404
20					3,86	0,404

n: Anzahl der untersuchten Tiere, SD: Standardabweichung, d: Tag

3.3 Gewichtsentwicklungen im Krankheitsverlauf

Bei der Gewichtsentwicklung zeigen sich bei den weiblichen Tieren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Im Durchschnitt liegt das Gewicht der weiblichen Tiere in der 5. Woche bei 18g. Ein Maximum von 22g wird in der 14. Woche erreicht. Mit zunehmender Schwere der Erkrankung verlieren die Tiere an Gewicht (ab der 14. Lebenswoche). Im Endstadium liegt das durchschnittliche minimale Gewicht zwischen 16g und 17g. Das bedeutet einen Gewichtsverlust von ca. 23 %.

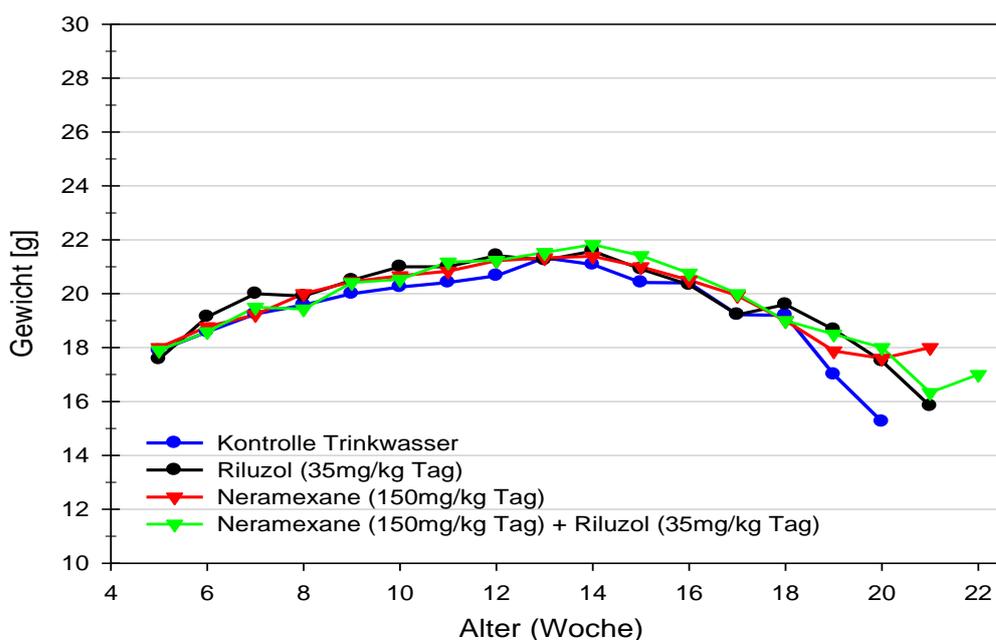


Abbildung 4: Gewichtsentwicklung der wöchentlich ermittelte Körpergewichte ab der 5. Lebenswoche pro Maus und Behandlungsgruppe (hier die weiblichen Tiere). Dargestellt sind die Mittelwerte in [g] aller transgenen weiblichen Tiere innerhalb einer Behandlungsgruppe pro Woche. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen fehlen.

Auch bei den männlichen Tieren zeigt sich kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen bei der Entwicklung des Körpergewichts. Im Durchschnitt beträgt das Gewicht in der 5. Woche 22g. Ein Maximum von 25g wird zwischen der 12. und 14. Woche erreicht. Wie bei den weiblichen Tieren zeigt sich mit zunehmender Schwere der Erkrankung eine Gewichtsabnahme, ebenfalls ab der 14. Lebenswoche. Im Endstadium liegt das mittlere Gewicht der männlichen Tiere zwischen 18g und 20g. Das entspricht einem Gewichtsverlust von ca. 20%.

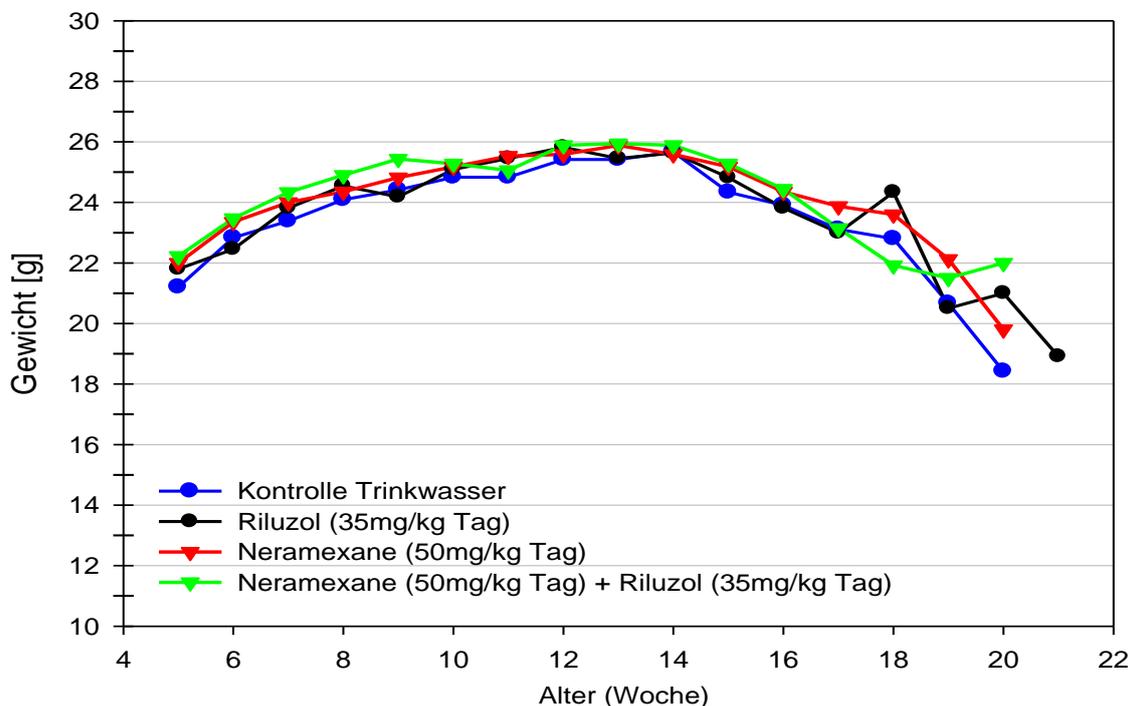


Abbildung 5: Gewichtsentwicklung der wöchentlich ermittelte Körpergewichte ab der 5. Lebenswoche pro Maus und Behandlungsgruppe (hier die männlichen Tiere). Dargestellt sind die Mittelwerte in [g] aller transgenen männlichen Tiere innerhalb einer Behandlungsgruppe pro Woche. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen fehlen.

3.4 Analyse der Überlebenszeit

Bei der Auswertung der Überlebenszeit zeigen sich geschlechtsabhängige Unterschiede in den einzelnen Behandlungsgruppen.

3.4.1 Deskriptive Statistik

In dieser Studie konnte bei den männlichen Tieren, die mit 35 mg/kg Riluzol am Tag behandelt wurden kein positiver Effekt auf das Überleben festgestellt werden. Den besten Effekt zeigten die männlichen Tiere, die mit Neramexane behandelt wurden; sie lebten gegenüber der Kontrollgruppe 7,8 Tage länger ($136,3 \pm 10,133$), während die Kombination aus

Neramexane und Riluzol lediglich einen Überlebensvorteil von 3,4 Tagen ($131,9 \pm 8,077$) gegenüber der Kontrollgruppe hatte.

Bei den weiblichen Tieren zeigte die Behandlung mit 35 mg/kg Riluzol am Tag einen geringen Überlebensvorteil von 2,7 Tagen. Den größten Überlebensvorteil hatten die weiblichen Tiere, die mit Neramexane und Riluzol behandelt wurden; sie lebten 8,4 Tage ($138,4 \pm 12,777$) länger als die Tiere der Kontrollgruppe ($130,0 \pm 9,045$). Die Wirksamkeit von Neramexane ist mit 4,1 Tagen ($134,1 \pm 9,1389$) nur halb so groß wie die Wirksamkeit der Kombinationslösung.

Tabelle 6: Überlebenszeit - Deskriptive Statistik und Normalverteilung-männliche transgene Mäuse

Überlebenszeit								
männliche Tiere	Tieranzahl	Mittelwert	SD	Differenz im Vergleich zur Kontrolle Trinkwasser (Tage)	Median	Min	Max	Normalverteilung
	n	Alter (Tage)						
Kontrolle Trinkwasser	12,00	128,5	10,086	-	128,0	111,0	148,0	ja
Riluzol 35 mg/kg Tag	11,00	128,7	10,061	0,2	125,0	116,0	148,0	ja
Neramexane 50 mg/kg Tag	14,00	136,3	10,133	7,8	136,5	119,0	151,0	ja
Neramexane + Riluzol 50 mg/kg Tag + 35 mg/kg Tag	13,00	131,9	8,077	3,4	132,0	118,0	147,0	ja

n: Anzahl der untersuchten Tiere, SD: Standardabweichung, Min: Minimum, Max: Maximum

In einer ersten deskriptiven Analyse werden die Parameter Normalverteilung, Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum in Bezug der Tage ermittelt. Die Differenz der Tage zur Kontrollgruppe Wasser wird unter Berücksichtigung des 95% igen Konfidenzintervall angegeben

Tabelle 7: Überlebenszeit - Deskriptive Statistik und Normalverteilung-weibliche transgene Mäuse

Überlebenszeit								
weibliche Tiere	Tieranzahl	Mittelwert	SD	Differenz im Vergleich zur Kontrolle Trinkwasser (Tage)	Median	Min	Max	Normalverteilung
	n	Alter (Tage)						
Kontrolle Trinkwasser	12,00	130,00	9,045	-	132,5	115,0	140,0	nein
Riluzol 35 mg/kg Tag	12,00	132,70	9,238	2,70	130,5	118,0	149,0	ja
Neramexane 150 mg/kg Tag	15,00	134,10	9,138	4,10	133,0	119,0	151,0	ja
Neramexane + Riluzol 150 mg/kg Tag + 35 mg/kg Tag	13,00	138,40	12,777	8,40	134,0	122,0	163,0	ja

n: Anzahl der untersuchten Tiere, SD: Standardabweichung, Min: Minimum, Max: Maximum

3.4.2 Log-Rank-Test und Kaplan-Meier-Plot

Ein global log-rank Test vergleicht alle Gruppen miteinander. Hier erfolgte die statistische Auswertung über die Software GraphPad Prism 5 Project™. Der Verlauf wird durch einen Kaplan-Meier-Plot illustriert. Bei der Analyse der Überlebenszeit ergaben sich bei dem globalen log-rank-Test keine signifikanten Unterschiede, weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Tieren. Ein signifikanter Überlebensvorteil im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich lediglich bei den weiblichen Tieren, in der kombinierten Behandlung mit Neramexane und Riluzol, $p=0,042$. (Tabelle 9, Tabelle 10). Die männliche Behandlungsgruppe Neramexane (50 mg/kg Tag) zeigt gegenüber der Kontrollgruppe einen positiven Trend ($p = 0,063$), während sich mit allen anderen Behandlungen keine statistisch signifikanten Ergebnisse hinsichtlich einer längeren Überlebenszeit nachweisen lassen.

Tabelle 8: Überlebenszeitanalyse - männliche Tiere

Überlebenszeit - männliche Tiere		
Behandlungsgruppen		Log rank [p]
Kontrolle Trinkwasser	Riluzol (35 mg/kg Tag)	0,835
Kontrolle Trinkwasser	Neramexane (50 mg/kg Tag)	0,063
Kontrolle Trinkwasser	Neramexane (50 mg/kg Tag) + Riluzol (35 mg/kg Tag)	0,701
globaler Log-rank-Test		0,231

p: Signifikanzniveau

Tabelle 9: Überlebenszeitanalyse – weibliche Tiere

Überlebenszeit - weibliche Tiere		
Behandlungsgruppen		log rank [p]
Kontrolle Trinkwasser	Riluzol (35 mg/kg Tag)	0,328
Kontrolle Trinkwasser	Neramexane (150 mg/kg Tag)	0,119
Kontrolle Trinkwasser	Neramexane (150 mg/kg Tag) + Riluzol (35 mg/kg Tag)	0,042
globaler Log-rank-Test		0,216

p: Signifikanzniveau

3.4.3 Kaplan-Meier-Kurve

Kaplan-Meier-Kurven sind Überlebenszeitkurven, die die Zeit zwischen einem Anfangs- und Endergebnis untersuchen. Es ist aufgezeichnet, in welchem zeitlichen Abstand ein einmaliges Ereignis – hier der Tod – in Relation zum individuellen Studienstart eintritt. Die zwei nachfolgenden Abbildungen zeigen geschlechtsspezifische Überlebenszeitkurven. Bei den weiblichen Tieren der Kombinationsgruppe ist ein signifikanter Behandlungseffekt im Vergleich zur Trinkwasser Kontrollgruppe nachweisbar. Bei den männlichen Tieren hingegen ist die Wirksamkeit von Neramexane höher als die der Kombinationsgruppe (vgl. auch Log-rank-Test), jeweils im Vergleich zur Trinkwasser Kontrollgruppe.

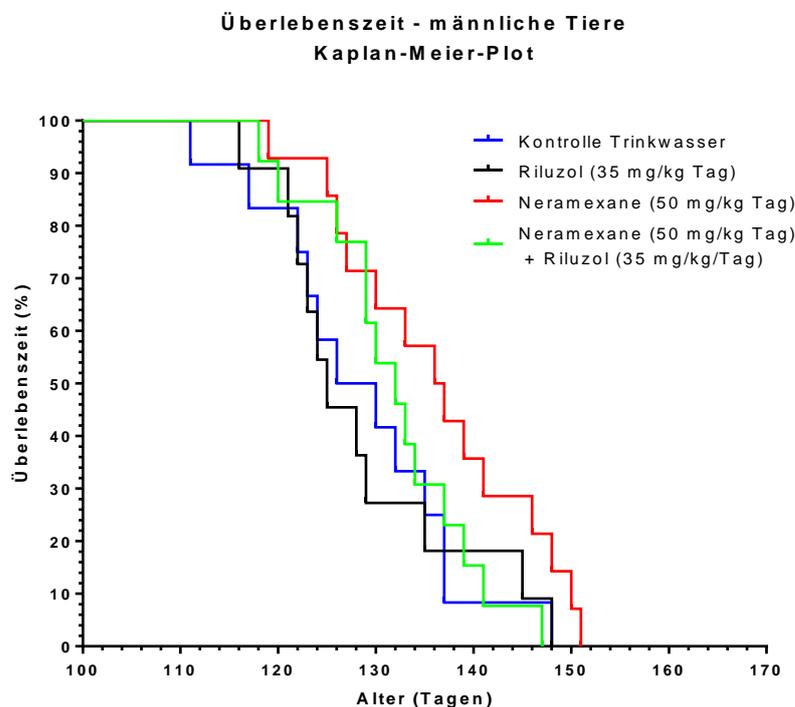


Abbildung 6: Krankheitsverlauf und Endpunkt der männlichen SOD^{G93A}-Tiere im Amyotrophe Lateralsklerose-Mausmodell. Die mit Neramexane behandelten Mäuse lebten gegenüber der Kontrollgruppe 7,8 Tage länger ($136,3 \pm 10,133$ [$p=0,063$]), während die Mäuse mit der Kombination aus Neramexane und Riluzol lediglich einen Überlebensvorteil von 3,4 Tagen ($131,9 \pm 8,077$) gegenüber der Kontrollgruppe hatte. Das Endstadium erreichten alle männlichen Mäuse im Alter von 149 ± 2 Tagen.

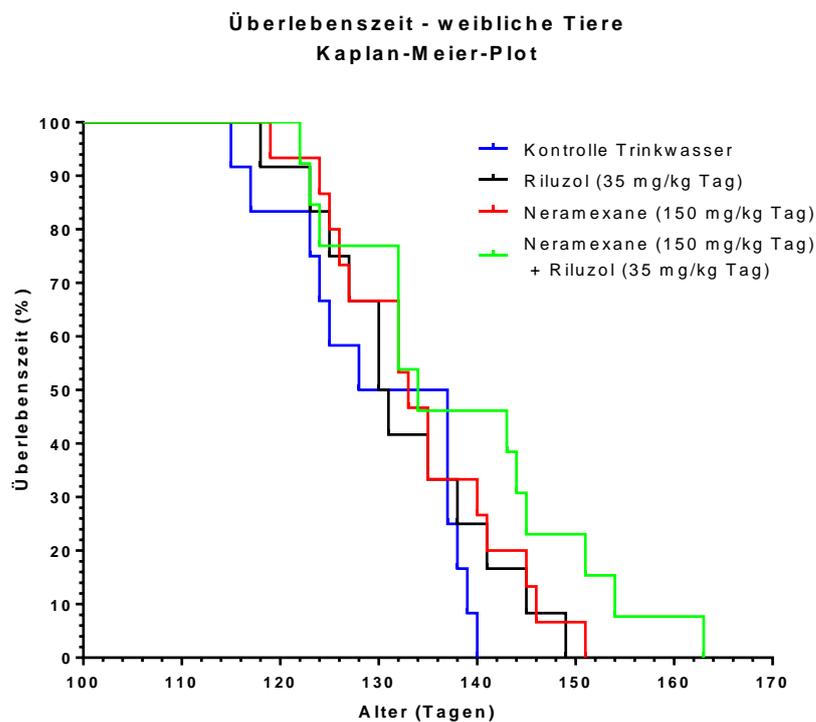


Abbildung 7: Krankheitsverlauf und Endpunkt der weiblichen SOD^{G93A}-Tiere im Amyotrophe Lateralsklerose-Mausmodell. Die mit Neramexane behandelten Mäuse lebten gegenüber der Kontrollgruppe 4,1 Tage ($134,1 \pm 9,1389$) länger, während die Mäuse mit der Kombination aus Neramexane und Riluzol einen signifikanten Überlebensvorteil von 8,4 Tagen ($138,4 \pm 12,777$ [$p=0,042$]) gegenüber der Kontrollgruppe hatte.

3.5 Analyse der motorischen Laufradaktivität

Im Alter von 38 Tagen wurden die Tiere dauerhaft und einzeln in einen Käfig gesetzt, der mit einem Laufrad ausgestattet ist. Die Aufzeichnung der Laufradaktivität erfolgt täglich von 18 Uhr bis 6 Uhr. Da die Tiere sich erst an das Laufrad gewöhnen müssen, nimmt die Laufradaktivität in den ersten Wochen konstant zu bis sie ein Plateau erreicht. Aus diesem Grund wurden die Daten zur motorischen Aktivität erst ab der achten Lebenswoche ausgewertet. Da die Laufradaktivität der männlichen Tiere in der präsymptomatischen Phase um ca. 60 % niedriger lag als bei den weiblichen Tieren erfolgte die Auswertung geschlechtsspezifisch. Die Behandlungsgruppen (Riluzol, Neramexane und Neramexane plus Riluzol) wurden jeweils mit der Trinkwasser Kontrollgruppe verglichen. Einen Überblick über

die ermittelten Werte geben die Tabelle 10 und Tabelle 11. Die grafische Darstellung der Laufradkurven zeigen die Abbildung 8 und Abbildung 9.

3.5.1 Auswertung der Laufradaktivität der weiblichen Tiere

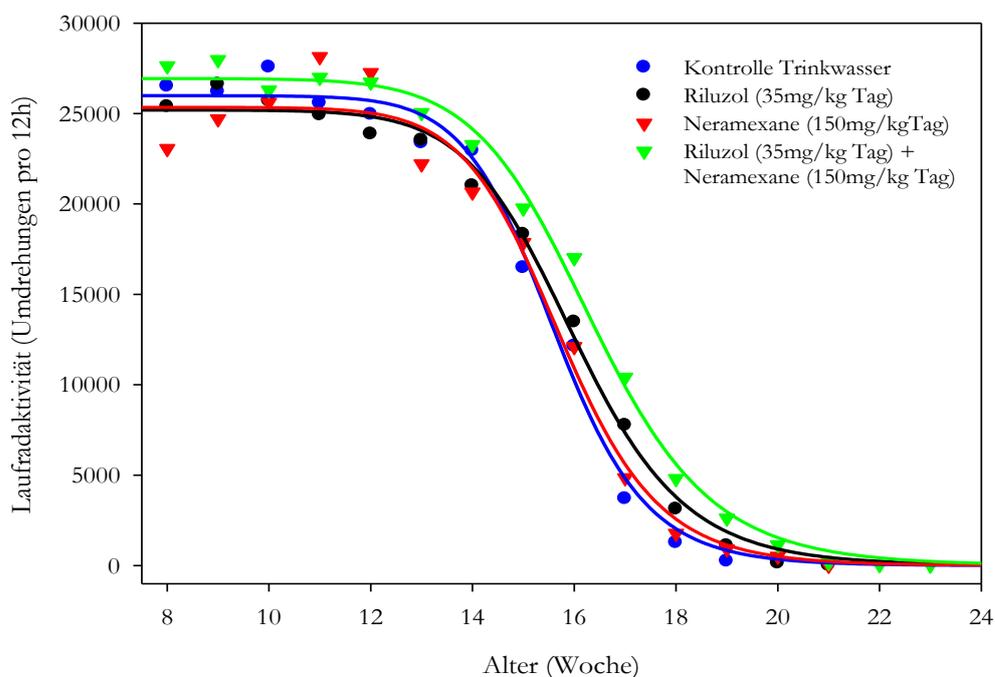


Abbildung 8: Grafische Darstellung der Laufradaktivität der weiblichen SOD^{G93A}-Tiere im Krankheitsverlauf mittels sigmoidalem Regressionsmodell nach HILL. Aufgezeigt sind die ab einem Lebensalter von 56 Tagen die wochenweise zusammengefassten Mittelwerte bei täglich 12 stündiger Aufzeichnungsphase. Präsymptomal ist die Laufradaktivität zwischen den Behandlungsgruppen nicht signifikant erhöht. Allerdings ist die durchschnittliche Aktivität von 25800U/12h bei homogenem Krankheitsfortschritt deutlich erhöht gegenüber den männlichen Mäusen. Sowohl die mit Riluzol behandelten Tiere als auch die Tiere mit der Kombinationslösung erreichen die halbmaximale Laufradaktivität 3 [p=0,014] bzw. 5 Tage [p<0,001] später gegenüber der Kontrolle Trinkwasser.

Tabelle 10: Übersicht über die Auswertung der motorischen Aktivität der weiblichen Tiere

weibliche Mäuse	Tieranzahl n	Laufradaktivität vor Symptombeginn (Hill-Parameter a) (Umdrehungen in 12h)	S.D.	Differenz (U 12h)	t-test (p)
Kontrolle Trinkwasser	11	25985,00	490,441		
Riluzol (35mg/kg Tag)	12	25195,00	367,760	-790,00	0,201
Kontrolle Trinkwasser	11	25985,00	490,441		
Neramexane (150mg/kg Tag)	13	25344,00	701,080	-641,00	0,496
Kontrolle Trinkwasser	11	25985,00	490,441		
Neramexane (150mg/kg Tag) + Riluzol (35mg/kg Tag)	13	26934,00	352,450	949,00	0,126
weibliche Mäuse	Tieranzahl n	Krankheitsfortschritt (Hill-Parameter b) (Umdrehungen 12h/Woche)	S.D.	Differenz (U 12h/Woche)	t-test (p)
Kontrolle Trinkwasser	11	-17,28	1,825		
Riluzol (35mg/kg Tag)	12	-14,69	1,098	2,58	0,229
Kontrolle Trinkwasser	11	-17,28	1,825		
Neramexane (150mg/kg Tag)	13	-16,15	2,400	1,13	0,733
Kontrolle Trinkwasser	11	-17,28	1,825		
Neramexane 150mg/kg Tag + Riluzol 35mg/kg Tag	13	-13,90	0,904	3,38	0,095
weibliche Mäuse	Tieranzahl n	Halbmaximale Laufradaktivität (Hill-Parameter c) (Woche)	S.D.	Differenz (Woche)	t-test (p)
Kontrolle Trinkwasser	11	15,61	0,113		
Riluzol (35mg/kg Tag)	12	16,00	0,097	0,39	0,014
Kontrolle Trinkwasser	11	15,61	0,113		
Neramexane (150mg/kg Tag) + Riluzol (35mg/kg Tag)	13	15,73	0,172	0,12	0,508
Kontrolle Trinkwasser	11	15,61	0,113		
Neramexane (150mg/kg Tag) + Riluzol (35mg/kg Tag)	13	16,36	0,092	0,74	<0,001

n: Anzahl der untersuchten Tiere, U: Umdrehungen, S.D. Standardabweichung

Laufradaktivität vor Symptombeginn – (HILL-Parameter a)

Bei den weiblichen Tieren ließen sich präsymptomatisch keine signifikanten Unterschiede in der Laufradaktivität zwischen den Behandlungsgruppen und der Trinkwasser Kontrollgruppe nachweisen. Im Vergleich zu Trinkwasserkontrolle war die präsymptomatische Laufradaktivität bei den Riluzol und Neramexane behandelten Tieren leicht erniedrigt (Riluzol, -790,00 U/12h und Neramexane, -641,00 U/12h), bei den Tieren, die die Kombinationslösung erhalten haben leicht erhöht (948,00 U/12h)

Krankheitsfortschritt – (HILL-Parameter b)

Auch im Krankheitsverlauf zeigten sich bei den weiblichen Tieren keine signifikanten Unterschiede bei den Behandlungsgruppen im Vergleich zur Trinkwasser Kontrollgruppe. Den schnellsten Krankheitsverlauf zeigten die unbehandelten Tiere der Trinkwasserkontrolle (-17,28 U/12h*Woche). Ähnlich schnell war der Krankheitsfortschritt bei den Neramexane behandelten Tieren (-16,15 U/12h*Woche). Der Krankheitsverlauf der mit Riluzol behandelten Tiere war mit -13,89 U/12h*Woche etwas langsamer, ebenso wie der Krankheitsfortschritt der Tiere, die die Kombinationslösung erhalten haben (-13,89 U/12h*Woche).

Tag der halbmaximalen Laufradaktivität– (HILL-Parameter c)

Vergleicht man die Behandlungsgruppen mit der Trinkwasser Kontrollgruppe hinsichtlich des Zeitpunkts an dem die maximale Laufradaktivität 50% zeigen sich signifikante Unterschiede bei den Riluzol behandelten Tieren ($p=0,014$) und den Tieren, die mit der Kombinationslösung Riluzol + Neramexane behandelt wurden ($p < 0,001$). Die mit Riluzol behandelten Tiere erreichten 50% ihrer maximalen Laufradaktivität 0,39 Wochen, d.h. 3 Tage später als die Tiere der Trinkwasser Kontrollgruppe; die mit der Kombinationslösung behandelten Tiere erreichten die halbmaximale Laufradaktivität 0,74 Wochen, d.h. 5 Tage später als die unbehandelten Tiere. Bei den mit Neramexane behandelten Tieren verzögerte sich der Tag an dem die Tiere 50% der maximalen Laufradaktivität erreichten lediglich um 0,12 Wochen, d.h. um einen Tag im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren.

3.5.2 Auswertung der Laufradaktivität der männlichen Tiere

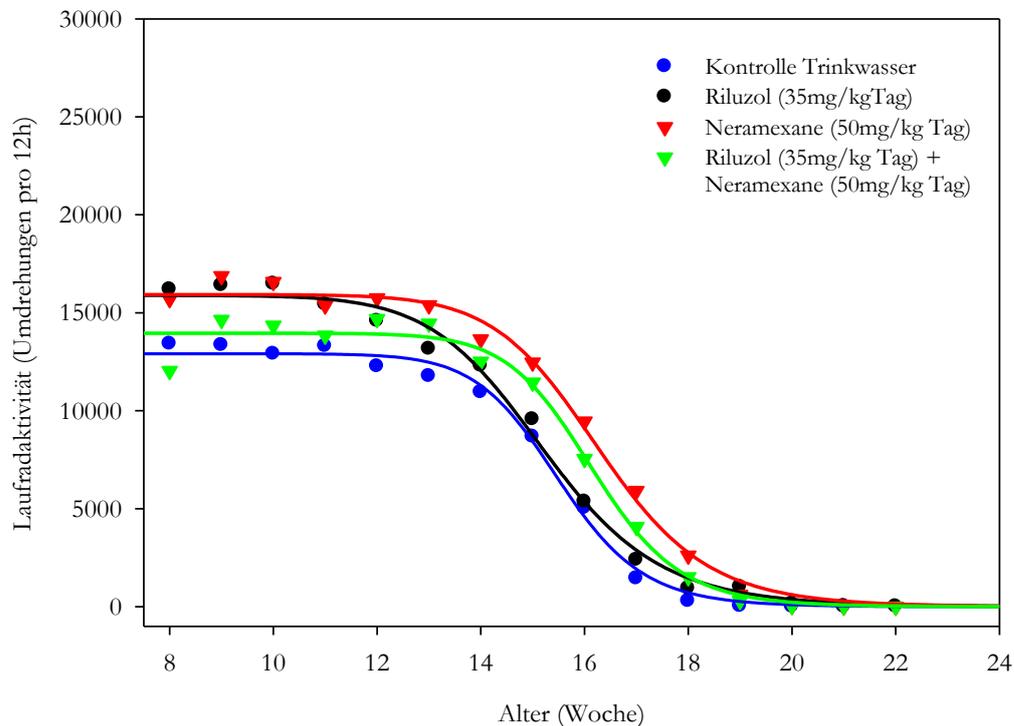


Abbildung 9: Grafische Darstellung der Laufradaktivität der männlichen SOD^{G93A}-Tiere im Krankheitsverlauf mittels sigmoidalem Regressionsmodell nach HILL. Aufgezeigt sind die ab einem Lebensalter von 56 Tagen die wochenweise zusammengefassten Mittelwerte bei täglich 12 stündiger Aufzeichnungsphase. Bereits präsymptomal ist die Laufradaktivität (durchschnittlich 14600U/12h) der 3 Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Riluzol vs Kontrolle [p<0,001], Neramexane vs Kontrolle [p<0,001], Neramexane+Riluzol vs Kontrolle [p=0,008]). Sowohl die mit Neramexane behandelten Tiere als auch die Tiere mit der Kombinationslösung erreichen die halbmaximale Laufradaktivität 6 bzw. 5 Tage später gegenüber der Kontrolle Trinkwasser [jeweils p<0,001].

Tabelle 11: Übersicht über die Auswertung der motorischen Aktivität der männlichen Tiere

männliche Mäuse	Tierzah n	Laufradaktivität vor Symptombeginn (Hill-Parameter a) (Umdrehungen pro 12h)	S.D.	Differenz (U 12h)	t-test (p)
Kontrolle Trinkwasser	12	12912,00	197,110		
Riluzol (35mg/kg Tag)	11	15890,00	277,050	2978,00	<0,001
Kontrolle Trinkwasser	12	12912,00	197,110		
Neramexane (50mg/kg Tag)	11	15931,00	240,082	3019,00	<0,001
Kontrolle Trinkwasser	12	12912,00	197,110		
Riluzol (35mg/kg Tag) + Neramexane (50mg/kg Tag)	11	13958,00	290,440	1046,00	0,008
männliche Mäuse	Tierzah n	Krankheitsfortschritt (Hill-Parameter b) (Umdrehungen 12h/Woche)	S.D.	Differenz (U 12h/Woche)	t-test (p)
Kontrolle Trinkwasser	12	-18,99	1,713		
Riluzol (35mg/kg Tag)	11	-13,65	1,115	5,34	0,018
Kontrolle Trinkwasser	12	-18,99	1,713		
Neramexane (50mg/kg Tag)	11	-15,72	1,278	3,26	0,136
Kontrolle Trinkwasser	12	-18,99	1,713		
Riluzol (35mg/kg Tag) + Neramexane (50mg/kg Tag)	11	-19,30	2,457	-0,31	0,921
männliche Mäuse	Tierzah n	Halbmaximale Laufradaktivität (Hill-Parameter c) (Woche)	S.D.	Differenz (Woche)	t-test (p)
Kontrolle Trinkwasser	12	15,51	0,087		
Riluzol (35mg/kg Tag)	11	15,23	0,110	-0,28	0,056
Kontrolle Trinkwasser	12	15,51	0,087		
Neramexane (50mg/kg Tag)	11	16,30	0,100	0,79	<0,001
Kontrolle Trinkwasser	12	15,51	0,087		
Riluzol (35mg/kg Tag) + Neramexane (50mg/kg Tag)	11	16,17	0,125	0,66	<0,001

n: Anzahl der untersuchten Tiere, U: Umdrehungen, S.D. Standardabweichung

Laufradaktivität vor Symptombeginn – (HILL-Parameter a)

Im Gegensatz zu den weiblichen Tieren zeigten bei den männlichen Tieren alle Behandlungsgruppen in der präsymptomalen Phase eine signifikant erhöhte motorische Aktivität im Vergleich zu der Trinkwasser Kontrollgruppe. Bei den mit Riluzol ($p < 0,001$) und mit Neramexane ($p < 0,001$) behandelten Tieren ist die präsymptomatische Aktivität um ca. 3000 Umdrehungen/12h erhöht. Bei den Tieren die die Kombinationslösung erhalten haben war motorische Aktivität um lediglich ca. 1000 Umdrehungen/12h erhöht ($p = 0,008$).

Krankheitsfortschritt – (HILL-Parameter b)

Eine signifikante Verlangsamung Krankheitsfortschritts im Vergleich zur Trinkwasser Kontrollgruppe ließ sich bei den männlichen Tieren nur bei den Riluzol behandelten Tieren erzielen ($p=0,018$). Der Krankheitsverlauf der Tiere der Neramexane Gruppe (-15,72 U/12h*Woche) war im Vergleich zu der Trinkwasser Kontrollgruppe ebenfalls verlangsamt; der Krankheitsverlauf der Tiere die mit der Kombinationslösung behandelt wurden war jedoch leicht beschleunigt (-19,29 U/12h*Woche).

Tag der halbmaximalen Laufradaktivität– (HILL-Parameter c)

Vergleicht man die Behandlungsgruppen mit der Trinkwasser Kontrollgruppe hinsichtlich des Tages an dem die maximale Laufradaktivität 50% ist, zeigen sich signifikante Unterschiede bei den mit Neramexane behandelten Tieren ($p<0,001$) und den Tieren die mit der Kombinationslösung Riluzol plus Neramexane behandelt wurden ($p< 0,001$). Die mit Neramexane behandelten Tiere erreichten 50% ihrer maximalen Laufradaktivität 0,79 Wochen, d.h. 6 Tage später als die Tiere der Trinkwasser Kontrollgruppe; die mit der Kombinationslösung behandelten Tiere erreichten die halbmaximale Laufradaktivität 0,66 Wochen, d.h. 5 Tage später als die unbehandelten Tiere. Überraschenderweise erreichten die mit Riluzol behandelten männlichen Tiere den Tag der halbmaximalen Laufradaktivität um 0,28 Wochen, d.h. 2 Tage früher als die unbehandelten Kontrolltiere.

3.6 Ergebnisse der Muskelkraftmessung

Aufgrund der Gewichtsunterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren erfolgte auch die Auswertung der Muskelkraft getrennt nach Geschlechtern (Abbildung 10 und Abbildung 11)

3.6.1 Auswertung der Muskelkraftmessung der weiblichen Tiere

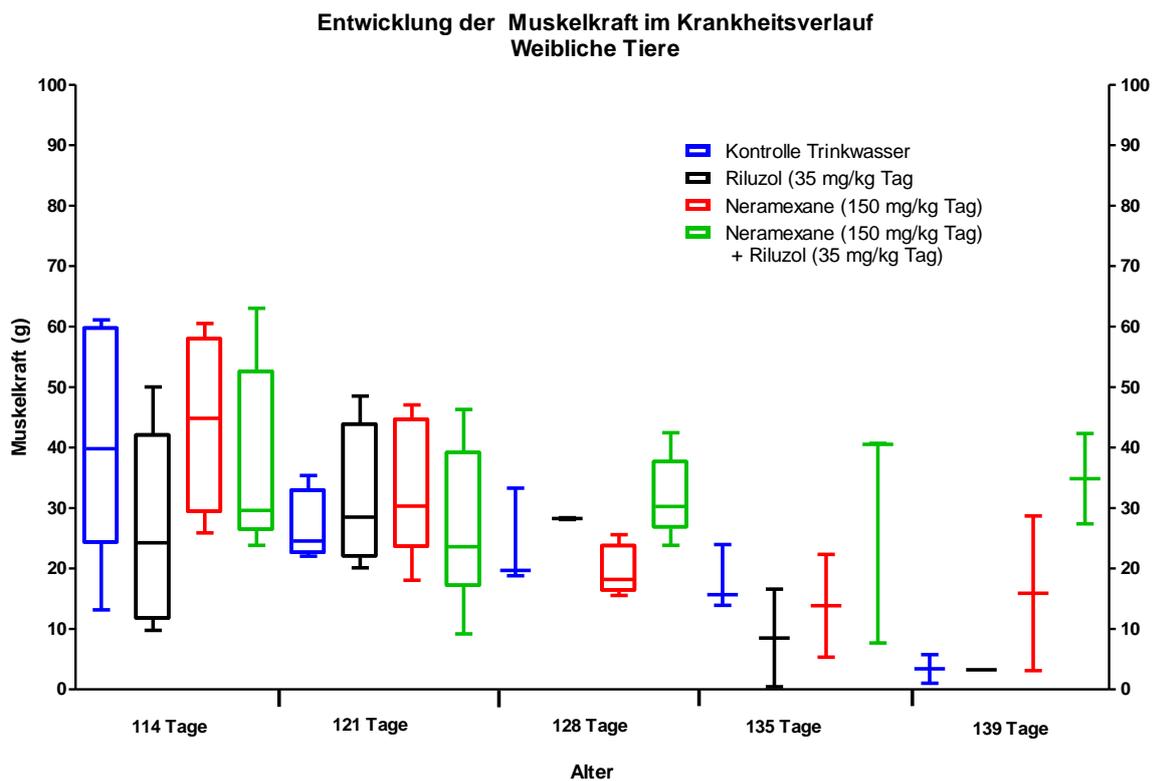


Abbildung 10: Muskelkraft der Hinterbeine bei den weiblichen Tieren während der symptomalen Phase der Erkrankung. Dargestellt sind die Mediane sowie die minimal und maximal-Werte.

Auffällig sind die zum Teil recht hohen Unterschiede bei der Muskelkraft in den einzelnen Behandlungsgruppen, die bereits im Alter von 114 Tagen zu erkennen waren. Deutlich wird, dass die Muskelkraft der weiblichen unbehandelten Kontrolltiere kontinuierlich abnahm. In Bezug zum Tag 114 betrug die Abnahme an den folgenden Messtagen jeweils ca. 10%. Der Median der Muskelkraft der Hintergliedmaßen betrug im Alter von 114 Tagen 40g und war im Endstadium (Alter 139 Tage) auf 3,0g reduziert. Dies entspricht einem Kraftverlust von 92,5%. Einen kontinuierlichen Kraftverlust zeigten auch die mit Riluzol behandelten Tiere. An Tag 114 lag der Median der Muskelkraft bei 24g und nahm mit zunehmender Schwere der Erkrankung ebenfalls auf 3,0g ab. Dies entspricht einem Kraftverlust von 87,5%. Die mit Neramexane und mit der Kombinationslösung behandelten Tiere zeigten zwar ebenfalls eine Abnahme der Muskelkraft, der im Zeitverlauf jedoch weniger stark ausgeprägt war. Darüber hinaus zeigten die Tiere noch im Alter von 139 Tagen, also kurz vor dem Erreichen des Endstadiums eine, gegenüber den Tieren der Trinkwasser Kontrollgruppe und den Riluzol-Tieren, deutlich erhöhte Muskelstärke. Aufgrund der insgesamt geringen Tieranzahlen und den hohen Schwankungen bei den Messwerten sind die Unterschiede in den Muskelstärken nicht signifikant. Jedoch ist deutlich erkennbar, dass die Muskelkraft der mit Neramexane sowie Riluzol plus Neramexane behandelten Tiere ab einem Alter von 135 Tagen besser erhalten blieb. Eine restliche Muskelkraft von 36,1% bei den Neramexane-Tieren und von den 93% bei den mit der Kombinationslösung behandelten Tieren (im Vergleich zur Muskelstärke an Tag 114) war noch im Alter von 139 Tagen vorhanden.

3.6.2 Auswertung der Muskelkraft der männlichen Tiere

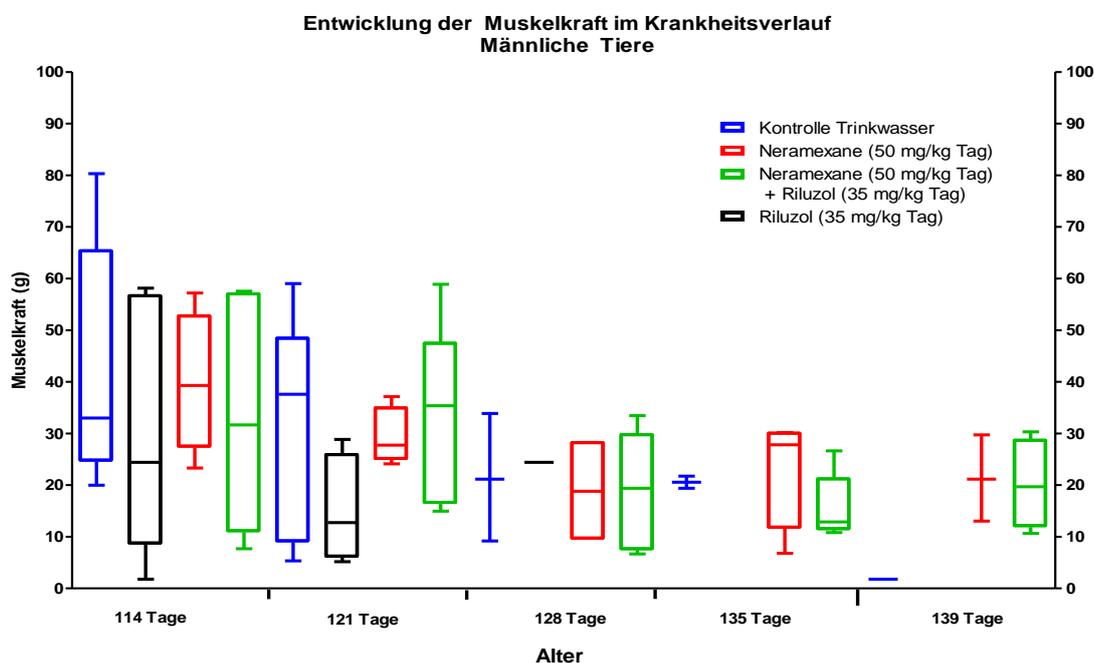


Abbildung 11: Muskelkraft der Hinterbeine bei den männlichen Tieren während der symptomalen Phase der Erkrankung. Dargestellt sind die Mediane sowie die minimalen und maximalen Werte.

Am Tag 114 war die Muskelstärke der Hintergliedmaßen bei den männlichen Tieren vergleichbar mit der Muskelkraft der weiblichen Tiere. Wie auch bei den weiblichen Tieren war bereits im Alter von 114 Tagen die Muskelkraft der Tiere in den einzelnen Behandlungsgruppen sehr unterschiedlich. Die Muskelkraft der männlichen unbehandelten Kontrolltiere nahm kontinuierlich ab; der Median der Muskelkraft der männlichen Tiere sank von 40g an Tag 114 auf 2g an Tag 139, das entspricht einem Kraftverlust von 95%. Die Muskelstärke der mit Riluzol behandelten Tiere sank von 24g auf 12g innerhalb in nur einer Woche; dies entspricht einem Kraftverlust von 50%. Im Alter von 128 Tagen lebte nur noch ein einziges männliches Tier der Riluzol-Gruppe. Auch bei den männlichen Tieren, die mit Neramexane und Neramexane plus Riluzol behandelt wurden, war die Abnahme der Muskelkraft im Krankheitsverlauf weniger stark ausgeprägt und die Tiere zeigten noch im Alter von 139 Tagen, also kurz vor dem Erreichen des Endstadiums, eine, gegenüber den Tieren der Trinkwasser Kontrollgruppe, deutlich erhöhte Muskelstärke. Aufgrund der insgesamt geringen Tieranzahlen und den hohen Schwankungen bei den Messwerten sind die

Ergebnisse

Unterschiede in den Muskelstärken nicht signifikant, aber es ist deutlich erkennbar, dass die Muskelkraft der mit Neramexane sowie der mit Riluzol plus Neramexane behandelten Tiere ab einem Alter von 135 Tagen besser erhalten blieb. Eine restliche Muskelkraft von 53,4% bei den Neramexane-Tieren und von knapp 60% bei den mit der Kombinationslösung behandelten Tieren (im Vergleich zu der Muskelstärke an Tag 114) war noch im Alter von 139 Tagen vorhanden.

3.7 Histologische Untersuchung des Musculus rectus femoris

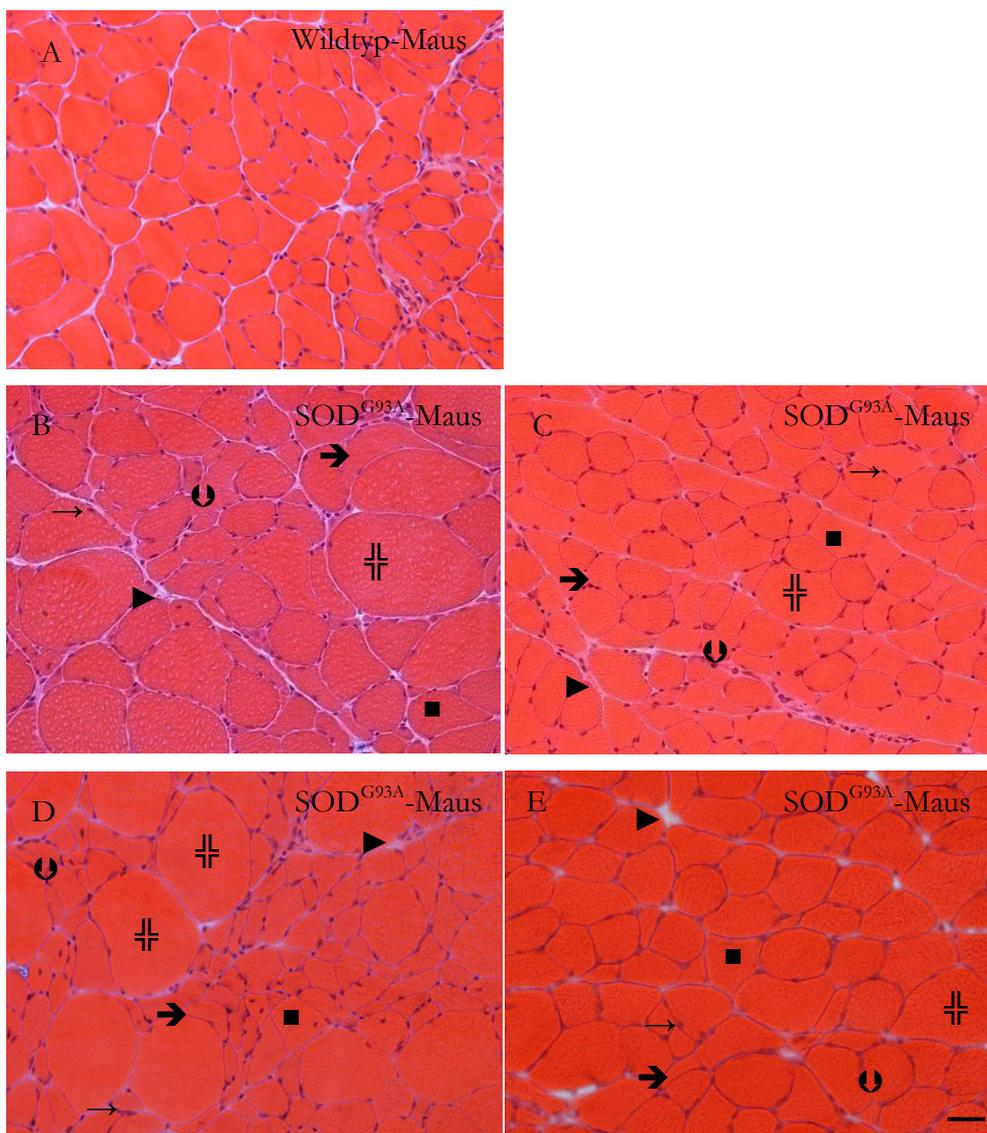


Abbildung 12: HE-Färbung des Musculus rectus femoris (20x Vergrößerung, Maßstabbalken: 50µm). A: Wildtyp-Maus, Lebenstag 130; B-E: transgene SOD^{G93A}-Maus Lebenstag 130 – 140. B: Kontrolle Trinkwasser; C: Riluzol behandelte Tiere; D: Neramexane behandelte Tiere; E: Neramexane plus Riluzol behandelte Tiere;

- ▶ verbreiterte Septen,
- ≡ hypertrophe Zellen,
- eckig, elongierte Zellen,
- sarkolemmal gelegene Zellkerne,
- ➔ halbmondförmiger Umbau von Muskelzellen (= neurogen),
- ⊖ atrophe Zellen

Abbildungsausschnitt 12A stellt einen gesunden Muskel bei einem Wildtyp-Tier dar. Die polygonalen Muskelzellen sind in ihrer Morphologie homogen (mosaikartig) und sind durch das Sarkolemm gleichmäßig umgeben. Dabei variiert der einzelne Muskelzellendurchmesser nur unwesentlich. Die Zellkerne sind meist randständig gelegen. Einzelne Muskelfasern werden durch das Endomysium getrennt. Das Perimysium beinhaltet mehrere in Gruppen liegende Muskelfasern, die einen Muskelfaszikel bilden.

Bei den transgenen Tieren (Abbildungen 12B – 12E) fiel ein inhomogenes Zellmuster auf mit erhöhter Variabilität der Durchmesser einzelner Muskelzellen (sog. Kalibervariation). Charakteristisch für den neurogenen Umbau ist die Koexistenz von atrophen (U) und normalen Muskelzellen, wie auch reaktiv hypertrophen Zellen (H). Ebenso treten sog. Angularfasern hervor. Das sind eckig, elongierte Muskelzellen (■) mit konkaven Zellgrenzen (→, halbmondförmiger Umbau). Es findet sich also eine Atrophie zahlreicher Muskelfasern, die insbesondere gesamte Muskelfaszikel betrifft.

Vereinzelt werden geschrumpfte Zellkerne gezählt, als Ausdruck atrophierter Muskelfasern im Endstadium. Lokalisiert sind diese Kernhaufen oder Zellkernkonglomerate (→) zur Hauptsache sarkolemmal. Unspezifische Hinweise, die sowohl für einen myogenen als auch neurogenen Umbau sprechen, sind die verbreiterten Septen (▶) mit sowohl anteiliger Bindegewebsvermehrung, als auch Fettvakatwucherungen.

Typischerweise treten bei ALS erkrankten Spezies neurogen veränderte Muskelfasern auf. Die spezifische Behandlung mit der Substanz Neramexane und dem Wirkstoff Riluzol, sowie in Kombination beider pharmakologisch wirksamen Stoffe hat keinen Einfluss auf die Morphologie der Muskelzelle.

3.8 Bestimmung des durchschnittlichen Muskelfaserdurchmessers

Neben der histologischen Befundung wurde der durchschnittliche Muskelfaserdurchmesser der einzelnen Gruppen bei den HE gefärbten Muskelschnitten bestimmt. Der im Vorfeld zufällig ausgewählte Bildausschnitt definiert die Anzahl der Muskelzellen, die ausgezählt werden (), wobei ein Minimum von 100 Zellen ausgezählt werden musste. So variierte die Anzahl der Muskelzellen pro Bildausschnitt bei den männlichen Tieren zwischen 100 und 177 Zellen und 100 – 158 Zellen bei den weiblichen Tieren. Insgesamt beinhalten Bildausschnitte

Ergebnisse

mit einem höheren Anteil an größeren Muskelfaserdurchmessern weniger Zellen und umgekehrt.

Nachfolgend sind die erhobenen Daten grafisch zusammengefasst in Abbildung 13.

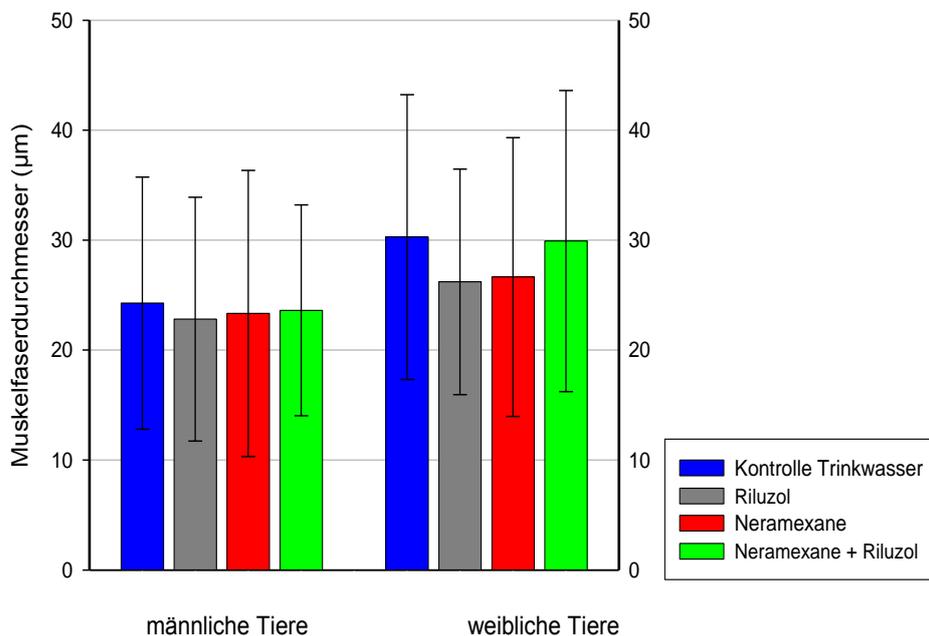


Abbildung 13: Die Mittelwerte der Muskelfaserdurchmesser im Endstadium. Eine geschlechts-spezifische Gegenüberstellung der Behandlungsgruppen.

Bei den männlichen Tieren sind die Muskelfaserdurchmesser ($24,3\mu\text{m} \pm 0,9\mu\text{m}$) der Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe größer, als die Muskelfaserdurchmesser aller behandelten männlichen Tiere, die ungefähr gleich sind. Ebenso bei den weiblichen Tieren; der Muskelfaserdurchmesser der weiblichen, unbehandelten transgenen Tiere beträgt $30,0\mu\text{m} \pm 1,02\mu\text{m}$. Damit ist der Muskelfaserdurchmesser der männlichen unbehandelten Tiere um 20% kleiner, als der der weiblichen unbehandelten Tiere.

Während die Zelldurchmesser der mit Riluzol und Neramexane behandelten weiblichen Tiere um ca. 11% kleiner sind im Vergleich zu der Trinkwasser Kontrollgruppe, sind die Muskelfaserdurchmesser der mit Neramexane plus Riluzol behandelten Tiere nur geringfügig kleiner (2,7%). Bei beiden Geschlechtern gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen und den Tieren der Trinkwasser Kontrollgruppe.

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Bemerkung zur Durchführung

Verschiedenste Forschergruppen mit dem Schwerpunkt „Neurodegenerative Erkrankungen“ haben unter anderem das Ziel die Pathogenese und die Pathomechanismen der Amyotrophen Lateralsklerose zu verstehen. Sukzessiv werden Teilschritte zum besseren Verständnis bekannt wonach auch pharmakologisch wirksame Substanzen diesen angepasst werden. Ausgehend von den positiven Studienergebnissen bezüglich des Wirkstoffs Riluzol wurde in der vorliegenden Arbeit Riluzol als Positivkontrolle eingesetzt.

Ebenso sollte die Wirksamkeit des neuen Wirkstoffs Neramexane, einer chemische Weiterentwicklung des Antidementivum Memantine, in dem SOD^{G93A} –Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose getestet werden. Eine Kombinationsgruppe beider Wirkstoffe sollte potentielle synergistische Effekte zeigen. Die Überlegung war die direkte und indirekte Blockade von Glutamatrezeptoren. Riluzol wirkt direkt an zentralnervösen Glutamatrezeptoren von zur Hauptsache präsynaptischen Endigungen, Neramexane dagegen blockiert indirekt über den Subtyp NMDA des Glutamatrezeptors. Beide Mechanismen führen zu einer Reduzierung der Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt und wirken so der Exzitotoxizität, welche als eine Ursache für ALS angesehen wird, entgegen. Die Versuche wurden an dem Tiermodell SOD^{G93A} durchgeführt, welches als etabliert in der Forschung an neurodegenerativen Erkrankungen gilt (Gurney et al, 1994). Mit der Wahl der G93A-Maus wurde ein der menschlichen Krankheit weitgehend ähnliches Tiermodell gewählt, so dass die experimentellen Voraussetzungen und Bedingungen mit der menschlichen Krankheit so weit als derzeit möglich übereinstimmten (Stieber A, 2000). Bei den mehr als 40 untersuchten Tieren waren die Geschlechter annähernd gleich verteilt. Aufgrund von Unterschieden beim Körpergewicht und der Laufradaktivität erfolgte die Auswertung aller untersuchten Parameter nach Geschlechtern getrennt.

4.2 Deskriptive Parameter

4.2.1 *Trinkwasserverbrauch*

Die geschlechterabhängige Dosierung von Neramexane beruhte auf den Ergebnissen pharmakokinetischer Untersuchungen der Firma Merz. Eine dreifach höhere Dosierung von Neramexane bei den weiblichen Tieren war notwendig um wirksame Blutplasmaspiegel zu erreichen. Auf den oralen Verbrauch an Wirkstofflösungen hatte die höhere Dosierung von Neramexane jedoch keinen Einfluss. Eine eventuelle Geschmacksaversion, die zu einem reduzierten Verbrauch an Wirkstofflösung führt, konnte in keiner Behandlungsgruppe festgestellt werden.

4.2.2 *Entwicklung des Körpergewichtes*

Die Messung des Körpergewichtes stellt einen objektiven Parameter dar. Der Verlust von Körpergewicht ist zwingend mit der Krankheit ALS vergesellschaftet, da aufgrund der fehlenden Muskelinnervation, bedingt unter anderem im Untergang von Motoneurone (Nau et al, 1995), die Muskulatur atrophiert. Sharp und Kollegen konnten einen Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Abnahme der Muskelmasse in den Läufen aufzeigen (Sharp et al, 2005). Mit dem Heranwachsen der Jungtiere steigt das Gewicht – von der jeweiligen Behandlungsgruppe – bis zur 12. Woche (94. Lebenstag) bei den Männchen. Für 2 Wochen wird das Niveau beibehalten und flacht dann ab dem Tag 110 ab. Die weiblichen Tiere erreichten ein Maximum erst in der 14. Woche. Das Ergebnis spiegelt die Ergebnisse von Smittkamp wider, wonach ab dem Tag 108 das Körpergewicht sinkt. Allerdings setzte sie die Gewichte der SOD-Tiere in Beziehung zu gesunden Kontrolltieren, wonach sich eine statistische Signifikanz ergab (Smittkamp et al, 2008). Sowohl bei den männlichen als auch weiblichen Tieren zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtsentwicklung zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen und der Trinkwasser-Kontrollgruppe.

4.2.3 Überleben

Die Überlebenszeit der unbehandelten Tiere zeigt keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern; sowohl die weiblichen wie auch männlichen Tiere erreichen ein Alter von ca. 129 – 130 Tagen bevor sie das Endstadium erreichen und aus tierschutzgründen getötet werden.

Bei den Riluzol behandelten Tieren konnte der in der Literatur beschriebene Effekt von einer Verlängerung der Überlebenszeit um 8-10 Tage (Bensimon et al, 1994) nicht reproduziert werden; dies könnte eventuell an einer zu niedrigen Dosierung von Riluzol liegen. In den beiden von Gurney publizierten Studien (1996 und 1998) wurde Riluzol im Futter verabreicht, allerdings in einer Dosierung von 50mg/kg Tag. Eine Erhöhung der Dosis auf 50mg/kg Tag im Trinkwasser könnte eventuell zu einer Verbesserung der Überlebenszeit führen.

Bei den weiblichen Tieren zeigen die Tiere, die mit Neramexane plus Riluzol behandelt wurden den besten Effekt hinsichtlich des Überlebens. Die weiblichen Tiere lebten, signifikant, 8 Tage länger als die weiblichen Tiere der Trinkwasser-Kontrollgruppe ($p=0,042$); bei den männlichen Tieren hingegen lebten die Tiere, die nur mit Neramexane behandelt wurden am längsten; 8 Tage im Vergleich zur männlichen Trinkwasser Kontrollgruppe ($p=0,063$). Geschlechterabhängige Effekte sind hinsichtlich des Überlebens keine Seltenheit; (Heiman-Patterson et al, 2005) vermutet wird u.a. eine unterschiedliche Wirksamkeit der verabreichten Substanzen aufgrund des unterschiedlichen Hormonstatus zwischen weiblichen und männlichen Tieren.

4.3 Funktionelle Parameter

4.3.1 Laufradaktivität

Zur Analyse der Laufradaktivität wurde ein sigmoidales Regressionsmodell verwendet. Mit Hilfe des verwendeten Regressionsmodells können drei Parameter bestimmt werden. Diese sog. HILL – Parameter sind wie folgt definiert: a: Laufradaktivität vor Symptombeginn, b: Krankheitsverlauf, c: Zeitpunkt, an dem die maximale motorische Aktivität um 50% halbiert ist.

Bei den weiblichen Tieren zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen nur bei dem Parameter c. Die Behandlung mit Riluzol zeigte bei den

weiblichen Tieren zwar keine Verlängerung der Überlebenszeit, jedoch konnte durch die Behandlung die motorische Aktivität der Tiere signifikant verbessert werden; die maximale Laufradaktivität ist, im Vergleich zu unbehandelten Tieren, erst drei Tage später auf 50% reduziert ($p=0,014$). Noch deutlicher ist dieser Effekt bei den Tieren die mit Neramexane plus Riluzol behandelt wurden. Die maximale Aktivität im Laufrad ist erst fünf Tage später um 50% reduziert als bei den unbehandelten Kontrolltieren ($p<0,001$). Außerdem ist die präsymptomatische Laufradaktivität der weiblichen Tiere, die mit Neramexane plus Riluzol behandelt wurde erhöht; es scheint, dass diese Tiere nicht nur präsymptomatisch aktiver sind, sondern auch während der symptomalen Phase der Erkrankung von der Behandlung profitieren.

Bei den männlichen Tieren fällt auf, dass die Laufradaktivität bereits in der präsymptomatischen Phase im Vergleich zu den weiblichen Tieren um ca. 60% reduziert ist. Dieser Effekt findet sich in allen präklinischen Studien mit SOD^{G93A}-Tieren im B6SJL-Hintergrund wieder (unveröffentlichte interne Daten präklinischer Studien). Eine Erklärung für diesen geschlechtsspezifischen Effekt konnte bisher nicht gefunden werden.

Bei den männlichen Tieren ist die präsymptomatische Laufradaktivität aller Behandlungsgruppen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren signifikant erhöht. Eine Verbesserung hinsichtlich des Krankheitsfortschrittes ist allerdings nur bei den Riluzol behandelten Tieren erkennbar ($p=0,018$). Diese Verbesserung setzt sich allerdings nicht weiter fort, da keine signifikante Verzögerung, bei dem Erreichen des Tages, an dem die maximale Aktivität um 50% reduziert ist, erreicht wird. Eine signifikante Verzögerung um 6 bzw. 7 Tage wird jedoch bei den Tieren erreicht, die mit Neramexane bzw. der Kombinationslösung behandelt wurden. Die Daten zur Laufradanalyse korrelieren größtenteils mit den Daten der Überlebenszeitanalyse. Bei Betrachtung dieser beiden Parameter profitieren die weiblichen Tiere am meisten von der Behandlung mit der Kombinationslösung, während die männlichen Tiere am meisten von der Behandlung mit Neramexane profitieren.

4.3.2 Muskelkraft

Sowohl bei den männlichen als auch weiblichen Tieren erkennt man in allen Gruppen eine kontinuierliche Abnahme der Muskelkraft im Krankheitsverlauf. Der Kraftverlust resultiert aus einer zunehmenden Atrophie der Muskulatur, die wiederum in degenerierenden Motoneuronen begründet liegt. Da bei den SOD^{G93A} Mäusen nur die Hinterläufe von Lähmungserscheinungen betroffen sind, wurde nur die Muskelkraft der Hinterläufe analysiert. Der Kraftverlust ist am stärksten bei den unbehandelten Tieren und den Riluzol behandelten Tieren ausgeprägt. Bei den weiblichen Tieren profitieren die Tiere, die mit der Kombinationslösung aus Neramexane und Riluzol behandelt wurden am stärksten, da ihre Muskelkraft im Krankheitsverlauf besser erhalten bleibt im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Bei den männlichen Tieren profitieren die mit Neramexane und der Kombinationslösung behandelten Tiere am meisten. Ein Nachteil dieser Methode ist die starke Schwankung der Einzelmesswerte. Aufgrund der hohen Streuung und der niedrigen Tieranzahl (n=5 pro Gruppe und Geschlecht) konnten keine signifikanten Unterschiede erzielt werden.

4.4 Muskelhistologie und Muskelfaserdurchmesser

Mit Hilfe histologischer Untersuchungen von Muskeln kann man deutliche Hinweise für den Grund der Veränderung der Muskeleigenschaften erhalten. Weist ein Muskel eckig elongierte Muskelfasern auf, so ist dies meist ein Zeichen für eine Schädigung des innervierenden Motoneurons (Frey et al., 2000) und wird als neurogene Veränderung bezeichnet. Diese Zellen werden kleiner, als Kompensationsmaßnahme werden einige Muskelfasern hypertroph. Je nach Erkrankung treten diese neurogen veränderten Muskelzellen vereinzelt oder in einer Gruppenatrophie auf (Dubowitz and Sewry, 2007). In dieser vorliegenden Arbeit waren bei allen Tieren, unabhängig von der Behandlungsgruppe klare Gruppenatrophien in mehreren Septen der Muskeln erkennbar. Dies ist typisch, da ein Motoneuron mehrere Muskelfasern innerviert. Damit konnte ein neurogener Umbau des Muskels bei den untersuchten SOD^{G93A}-Tieren nachgewiesen werden. Ein Einfluss der Behandlung auf die Muskelmorphologie war jedoch nicht nachweisbar. Ebenso konnte kein Behandlungseffekt auf den Muskeldurchmesser gezeigt werden. Das könnte daran liegen, dass sich zum

Untersuchungszeitpunkt die Tiere aller Behandlungsgruppen im Endstadium befanden. Befindet sich ein Tier im Endstadium ist die Degeneration der Motoneurone, unabhängig von der Behandlung, vermutlich so weit fortgeschritten, dass keine Unterschiede in der Muskelmorphologie und im Muskelfaserdurchmesser mehr nachweisbar sind. Interessanterweise konnte jedoch auffällige Unterschiede im Muskelfaserdurchmesser zwischen unbehandelten männlichen und unbehandelten weiblichen Tieren im Endstadium gezeigt werden. Da der primäre Endpunkt in dieser Studie die Lebensspanne der Tiere war, konnten die histologischen Präparate nur im Endstadium der Erkrankung untersucht werden. Die histologische Untersuchung der Muskeln sowie der Muskelfaserdurchmesser im Krankheitsverlauf war, aufgrund der festgelegten Tieranzahl im Tierversuch, nicht möglich.

4.5 Preclinical research guidelines 2010

Innerhalb der menschlichen Bevölkerung ist die Erwartungshaltung an die Pharmaindustrie groß. Bei den Angehörigen und den Patienten selbst ist das Wissen um eine unheilbare Krankheit, dazu gehört eben auch ALS, ein prognostisch ungünstiger Marker. Betroffene und deren Angehörige setzen sehr viel Hoffnung in die Umsetzung der positiven Tierforschungsergebnisse. Hierbei muss deutlich gemacht werden, dass die Effekte von Mausmodellen sich nicht nahtlos auf humane Projekte übertragen lassen (Ludolph et al, 2010), denn die Übertragung der Ergebnisse präklinischer Studien in der Klinik erweist und gestaltet sich eher schwierig. Prinzipiell ist das SOD^{G93A}-Mausmodell sehr gut validiert, auch wenn Studien ein negatives Outcome hervorbringen. Beim *high copy* SOD^{G93A}-Mausmodell zeigt sich eine starke Vakuolisierung der Motoneurone, die beim Patienten nicht zu finden ist. Ausserdem gibt es Überlegungen, dass die starke Überexpression der humanen mutierten SOD1 von Nachteil bei der Translation der präklinischen Daten in die Klinik ist. Aufgrund der 18-fachen Kopienzahl an humaner mutierter SOD1^{G93A} kommt es zu einer 4-fachen Überexpression an mutierter SOD, die den Krankheitsverlauf der Maus stark beschleunigt; bei Patienten mit SOD-Mutation hingegen ist nur ein Allel mutiert und der Krankheitsverlauf ist entsprechend langsamer. Neben den Limitationen des *high copy* SOD^{G93A}-Mausmodells liegen die Fehler oft in der methodischen Ausarbeitung einzelner Arbeitsgruppen (Ludolph et al, 2010). Um die Validität der Mausmodelle sowie die gezielte Struktur von methodischen

Abläufen in Zukunft zu wahren, wurden erstmals 2006 zunächst auf europäischer Ebene, dann 2009 auf internationaler Ebene „Guidelines for preclinical animal research in ALS/MND“ (Ludolph et al, 2010) definiert Grundsätzlich kann in der hier durchgeführten Studie, von einem hohen Charakter an Gültigkeit ausgegangen werden, da sie die Kriterien der in den Jahren 2006 und 2010 publizierten Richtlinien weitgehend erfüllt. Allerdings muss auch erwähnt werden, dass die Gültigkeit durch die Verwendung nur eines Mausstammes herabgesetzt ist. Sinnvoll wäre daher die Evaluierung der Ergebnisse in anderen ALS-Mausmodellen, z.B. Fus- oder TDP-43 Modell, die allerdings zurzeit noch nicht validiert sind. Sinnvoll wäre auch die Wiederholung des Versuchs in dem *low copy* SOD^{G93A}-Mausmodell, das nur 8 Kopien an humaner mutierter SOD trägt und eine längere Überlebenszeit aufweist. Ein Problem ist das Wissen um wissenschaftliche Arbeiten mit negativem Ausgang. Diese werden nicht veröffentlicht und stehen daher nicht zum Erfahrungsaustausch bereit. Möglicherweise werden Versuche unnötig wiederholt aufgrund der Unkenntnis und überspannen damit auch den finanziellen Bogen. Jenes ist durch strikte Vorgaben im Vorfeld ebenfalls besser planbar.

5 Zusammenfassung

In zahlreichen Untersuchungen konnten unterschiedlichste Mutationen als Ursache des klinischen Bildes der amyotrophen Lateralsklerose nachgewiesen werden. Über die pathophysiologische Bedeutung dieser Tatsache im Hinblick auf den schleichenden Beginn mit rascher Progredienz und die sich daraus differierende Schwere des Krankheitsbildes ist jedoch noch vieles unklar. Der therapeutische Schwerpunkt der amyotrophen Lateralsklerose konzentriert sich derzeit auf die Verbesserung der Symptome. Medikamente jedoch haben die Eigenschaft auf molekularbiologischer und biochemischer Art und Weise in die Pathogenese einzugreifen. Substanzen, die im zentralnervösen Glutamathaushalt interagieren, regulieren akute oder chronische Neurodegeneration. Ein besonderes Interesse gilt dabei den N-methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptorantagonisten mit der Fähigkeit die pathologische Konzentrationserhöhung von Glutamat zu regulieren. Neramexane ist die chemische Weiterentwicklung in oralisierter Form von Memantine und greift als Antagonist am NMDA Rezeptor an. Memantine wurde subkutan appliziert und war Grundlage in einer Studie von Wang R, 2005 mit signifikant positiven Ergebnissen bzgl. des Überlebens.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung eines potentiell lebensverlängernden Effekts des NMDA-Rezeptorantagonisten Neramexane im etablierten ALS - Mausmodell B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur/J. Als Positivkontrolle wurde der unspezifische Glutamatantagonist Riluzol verwendet; transgene Wurfgeschwister, denen reines Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung stand, dienten als Negativkontrolle. Die Behandlung aller Tiere startete präsymptomal. Der primäre Endpunkt der Arbeit war das Überleben der Tiere. Zusätzlich wurde die motorische Aktivität beurteilt, die Entwicklung der Muskelkraft der hinteren Extremitäten und das Körpergewichts der Tiere im Krankheitsverlauf. Im Endstadium erfolgte die morphologische Beurteilung des Musculus rectus femoris und der Muskelfaserdurchmesser.

Die Hoffnung, dass Neramexane ähnlich positive Ergebnisse liefert wie Memantine in einer Studie von Wang R, 2005, konnte nicht zur Gänze aufrecht erhalten werden. Die Männchen profitierten am meisten von der Einzelapplikation von Neramexane hinsichtlich der Parameter Überleben, dem Zeitpunkt an dem die maximale Laufradaktivität halbiert ist und der Erhaltung der Muskelkraft, bei den Weibchen gilt dies für die Applikation der

Zusammenfassung

Kombinationslösung von Neramexane plus Riluzol. Möglicherweise sind geschlechtspezifische biochemische Unterschiede, wie z.B. ein unterschiedlicher Hormonstatus für diese Effekte verantwortlich. Die publizierten positiven Effekte einer Riluzol-Behandlung auf das Überleben der SOD^{G93A}-Tieren konnte in dieser Studie bei einer Dosierung von 35mg/kg Tag nicht reproduziert werden. In höherer Dosierung, beispielsweise 50mg/kg Tag, erzielte Riluzol in vorangegangenen wissenschaftlichen Untersuchungen signifikante Effekte. In einer anzustrebenden Wiederholung der Versuche sollte die Dosierung von Riluzol erhöht werden. Weitere Untersuchungen in einem anderen Mausmodell, z. Bsp. der *low copy* SOD^{G93A}- Maus mit nur ca 8-fach erhöhter Kopienzahl und/oder mit höherer Tierzahl bei den funktionellen Tests sind nötig um die potentielle Effektivität von Neramexane bei der Therapie der ALS weiter zu evaluieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Aboussouan LS, Khan SU, Meeker DP, Stelmach K, Mitsumoto H (1997) Effect of Noninvasive positive-pressure ventilation and survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Intern Med* 127: 450-453
2. Almer G (2003) Amyotrophe Lateralsklerose: Überlegungen zu Ursprung und Pathophysiologie der Erkrankung. *J Neurol Neurochir Psychiatr* 4: 6-12
3. Angenstein F, Niessen HG, Goldschmidt J, Vielhaber S, Ludolph AC, Scheich H (2004) Age-dependent changes in MRI of motor brain stem nuclei in a mouse model of ALS. *NeuroReport* 15: 2271-2274
4. Arundine M, Tymiansky M (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* 61: 657-668
5. Barohn RJ, Rowland LP (2002) Neurology and gulf war veterans. *Neurology* 59: 1484-1485
6. Benatar M (2007) Lost in translation: treatment trials in the SOD1 mouse and in human ALS. *Neurobiol Dis* 26: 1-13
7. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V (1994) A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Study Group. *N Engl J Med* 330: 585-591
8. Blair IP, Williams KL, Warraich ST, Durnall JC, Thoeng AD, Manavis J, Blumbergs PC, Vucic S, Kiernan MC, Nicholson GA (2010) FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neuropathophysiological and genetic analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81: 639-645
9. Borasio GD, Voltz R (1998) Palliative Therapie bei amyotropher Lateralsklerose (ALS). *Aktuel Neurol* 25: 115-122
10. Braunstein KE (2008) Untersuchungen von Motorik, Kognition und Verhalten bei Mausmodellen von Motoneuronenerkrankungen. Dissertation, Universität Ulm
11. Brooks BR (1996) Clinical epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Clin* 14: 399-420
12. Bruijn LI, Miller TM, Cleveland DW (2004) Unravelling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27: 723-749

13. Dal Canto MC, Gurney ME (1994) Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 145: 1271-1279
14. Danysz W, Parsons CG (2002) Neuroprotectiv potential of ionotropic glutamate receptor antagonists. *Neurotox Res* 4: 119-126
15. Dengler R, Tröger M (1997) Impact of riluzole on the relationship between patient and physician. *J Neurol* 244: 30- 32
16. Doble A (1996) The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* 47: 233-241
17. Dormann D, Haass C (2011) TDP-43 and FUS: a nuclear affair. *Trends Neurosci*: 1-10
18. Dunkley T, Huentelman MJ, Craig DW, Pearson JV, Szelinger S, Joshipura K, Halperin RF, Stamper C, Jensen KR, Letizia D, Hesterlee SE, Pestronk A, Levine T, Bertorini T, Graves MC, Mozaffar T, Jackson CE, Bosch P, McVey A, Dick A, Barohn R, Lomen-Hoerth C, Rosenfeld J, O'connor DT, Zhang K, Crook R, Ryberg H, Hutton M, Katz J, Simpson EP, Mitsumoto H, Bowser R, Miller RG, Appel SH, Stephan DA (2007) Whole-genome analysis of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *New Engl J Med* 357: 775-788
19. Dubowitz V, Sewry CD (2007) *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. Saunders Elsevier, Philadelphia, 3rd Edition: 3-40
20. Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, Oudart H, de Tapia M, Barbeito L, Loeffler JP (2004) Mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis: a trigger and a target. *Neurodegener Dis* 1: 245-254
21. Dupuis L, Pradat PF, Ludolph AC, Loeffler JP (2011) Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 10: 75-82
22. Eisen A, Calne D (1992) Amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and Alzheimer's disease: phylogenetic disorders of the human neocortex sharing many characteristics. *Can J Neurol Sci* 19: 117-123
23. Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak PA, Glass JD (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185: 232-240
24. Fischer LR, Glass JD (2007) Axonal Degeneration in Motor Neuron Disease. *Neurodeg Dis* 4: 431-442

25. Frank I (2005) Synthese von dualen NMDA-Rezeptor-/Dopamin-Rezeptor-Liganden. Dissertation, Universität Frankfurt/Main
26. Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P (2000) Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* 20: 2534-2542
27. Gaglio T, Dionne MA, Compton DA (1997) Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes. *J Cell Biol* 138: 1055-1066
28. Garruto RM, Fukatsu R, Yanagihira R, Gajdusek DC, Hook G, Fiori CE (1984) Imaging of calcium and aluminium in neurofibrillary tangle-bearing neurons in parkinsonism-dementia of Guam. *Proc Nat Acad Sci USA* 81: 1875-1879
29. Gaudette M, Hirano M, Siddique T (2000) Current status of SOD1 mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophe Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1: 83-89
30. Gubbay SS, Kahana E, Zilber N, Cooper G, Pintov S, Leibowitz Y (1985) Amyotrophic lateral sclerosis. A study of its presentation and prognosis. *J Neurol* 232: 295-300
31. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX (1994) Motor neuron degeneration in mice that express human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264: 1772-1775
32. Gurney ME (2000) *BioEssays* 22, 297-304
33. Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annuar A, Bowen S, Lalli G, Witherden AS, Hummerich H, Nicholson S, Morgan PJ, Oozageer R, Priestley JV, Averill S, King VR, Ball S, Peters J, Toda T, Yamamoto A, Hiraoka Y, Augustin M, Korthaus D, Wattler S, Wabnitz P, Dickneite C, Lampel S, Boehme F, Peraus G, Popp A, Rudelius M, Schlegel J, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Schiavo G, Shima DT, Russ AP, Stumm G, Martin JE, Fisher EM (2003) Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 300: 808-812
34. Hegedus J, Putman CT, Gordon T (2007) Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2: 154-164

35. Heiman-Patterson TD, Deitch JS, Blankenhorn EP, Erwin KL, Perreault MJ, Alexander BK, Byers N, Toman I, Alexander GM (2005) Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)^{1Gur} mouse model of ALS. *J Neurol Sci* 236: 1-7
36. Hesselink MB, Parsons CG, Wollenburg C, Danysz W (1999) Brain distribution of an uncompetitive NMDA receptor antagonist. Comparison to its in vitro potency in electrophysiological studies. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 360: 144–150
37. Hille JM (2003) Die Trinukleotid-Expansion des Gens für zelluläre Glutathion-Peroxidase bei Patienten mit sporadischer amyotropher Lateralsklerose. Med Dissertation, Humboldt-Universität Berlin
38. Holzbaur EL, Tokito MK (1996) Localization of the DCTN1 gene encoding p150Glued to human chromosome 2p13 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 31: 398-399
39. Jirgensons A, Kauss V, Kalvinsh I, Gold MR, Danysz W, Parsons CG, Quack G (2000) Synthesis and structure–affinity relationships of 1,3,5-alkylsubstituted cyclohexylamines binding at NMDA receptor PCP site. *Eur J Med Chem* 35: 555-565
40. Jokelainen M (1977) Amyotrophic lateral sclerosis in Finland. II. Clinical characteristics. *Actual Neurol Scand* 56: 194-204
41. Jones MW, McClean M, Parsons CG, Headley PM (2001) The in vivo relevance of the varied channel-blocking properties of uncompetitive NMDA antagonists: tests on spinal neurones. *Neuropharmacology* 41: 50–61
42. Jonsson PA, Graffmo KS, Andersen PM, Brannstrom T, Lindberg T, Oliveberg M, Marklund SL (2006) Disulphide-reduced superoxide dismutase in CNS of transgenic ALS models. *Brain* 129: 451-464
43. Josephs KA, Whitwell JL, Knopman DS, Hu WT, Stroh DA, Baker M, Rademakers R, Boeve BF, Parisi JE, Smith GE, Ivnik RJ, Petersen RC, Jack Jr. CR, Dickson DW (2008) Abnormal TDP-43 immunoreactivity in AD modifies clinicopathological and radiological phenotype. *Neurology* 70: 1850-1857
44. Julien JP (2006) Mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Drug Discovery: Today Disease Models*: 331-339
45. Kempf KU (2006) Analyse des Phänotyps von an Amyotropher Lateralsklerose erkrankter Familien ohne Mutation der Superoxid-1-dismutase:

- Eine Untersuchung zur Vorbereitung von Kopplungsanalysen. Med Dissertation, Universität Ulm
46. Koh SH, Lee SM, Kim HY, Lee KY, Lee YJ, Kim HAT, Kim J, Kim MH, Hwang MS, Song C, Yang KW, Lee KW, Kim SH, Kim OH (2006) The effect of epigallocatechin gallate on suppressing disease progression of ALS model mice. *Neurosci Letters* 395: 103–107
 47. Köles L, Wirkner K, Illes P (2001) Modulation of Ionotropic Glutamate Receptor Channels. *Neurochem Res* 26: 925-932
 48. Körner S, Dengler R, Petri S (2010) Diagnostik der amyotrophen Lateralsklerose. *J Neurol Neurochir Psychiatr* 11: 1-5
 49. Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V (1996) Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 347: 1425-1431
 50. Liu Y, Belayev L, Zhao W, Busto R, Ginsberg MD (2000) A novel uncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonist, reduces infarct volume and brain swelling and improves neurological deficit after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 862: 111–119
 51. Ludolph AC, Dengler R, Zierz S (2000) Amyotrophe Lateralsklerose: Geschichte, Epidemiologie und diagnostische Kriterien. 2. Aufl., Thieme, Stuttgart: 1-16
 52. Ludolph AC (2006) Matrix metalloproteinase - a conceptual alternative for disease-modifying strategies in ALS/MND? *Exp Neurol* 201: 277-280
 53. Ludolph AC, Bendotti C, Blaugrund E, Chio A, Greensmith L, Loeffler JP, Mead R, Niessen HG, Petri S, Pradat PF, Robberecht W, Ruegg M, Schwalenstoecker B, Stiller D, van den Berg L, Vieira F, von Horsten S (2010) Guidelines for preclinical research in ALS/MND: A consensus meeting. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 11: 38-45
 54. Lulé D, Ludolph AC, Birbaumer N, Kübler A (2008) Depressionen und Lebensqualität bei Patienten mit amyotropher Lateralsklerose. *Dtsch Arztebl* 105: 397-403
 55. Lynch, DR, Guttman, RP (2001) NMDA Receptor Pharmacology: Perspectives from Molecular Biology. *Curr Drug Targets* 2: 215-231
 56. Lynch, DR, Guttman, RP (2002) Excitotoxicity: Perspectives Based on N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subtypes. *J Pharmacol Exp Therapy* 300: 717-723
 57. Mackenzie IRA, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ (2007)

- Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD 1 mutations. *Ann Neurol* 61: 427-434
58. Mackenzie IRA, Rademakers R, Neumann M (2010) TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 9: 995-1007
59. Martin LJ, Liu Z, Chen K, Price AC, Pan Y, Swaby JA, Golden C (2007) Motor Neuron Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mutant Superoxide Dismutase-1 transgenic Mice: Mechanisms of Mitochondriopathy and Cell Death. *J Comp Neurol* 500: 20-46
60. Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF, Manfredi G (2002) Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* 277: 29626-29633
61. Mazzini L, Corra T, Zaccala M, Mora G, Del Piano M, Galante M (1995) Percutaneous Endoscopic gastrostomy and enteral nutrition in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 242: 695-698
62. Miana-Mena FJ, Munoz MJ, Yague G, Mendez M, Moreno M, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R (2005) Optimal methods to characterize the G93A mouse model of ALS. *Amyotrophe Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 6: 55-62
63. Mitsumoto H (1995) New therapeutic approaches: rationale and results. *Motor Neuron Disease: Biology and Management*. Springer, London: 419-441
64. Muehlhardt C (1999) *Der Experimentator: Molekularbiologie*. Springer, Berlin: 116-118
65. Munch C, Sedlmeier R, Meyer T, Homberg V, Sperfeld AD, Kurt A, Prudlo J, Peraus G, Hanemann CO, Stumm G, Ludolph AC (2004) Point mutations of the p150 subunit of dynactin (*DCTN1*) gene in ALS. *Neurology* 63: 724-726
66. Naish HJ, Marsh WL, Davies JA (2002) Effect of low-affinity NMDA receptor antagonists on electrical activity in mouse cortical slices. *Eur J Pharm* 443: 79-83
67. Nau KL, Bromberg MB, Forsheo DA, Katch VL (1995) Individuals with amyotrophic lateral sclerosis are in caloric balance despite losses in mass. *J Neurol Sci* 129: 47-49
68. Neudert C (2004) Verlauf und palliativmedizinische Behandlung in der Terminalphase bei Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose. Med Dissertation, Universität München
69. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR,

- Feldman H, Feiden W, Kretschmar HA, Trojanowski JQ, Lee V MY (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314: 130–133
70. Newsom-Davis IC, Lyall RA, Leigh PN, Moxham J, Goldstein LH (2001) The effect of non-invasive positive pressure ventilation (NIPPV) on cognitive function in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a prospective study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 7: 482-487
71. Nirmalanathan N, Grennsmith L (2005) Amyotrophic Lateral Sclerosis: Recent advances and future therapies. *Curr Opin Neurol* 18: 712-719
72. Orrell RW (2007) Understanding the causes of amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 357: 822-823
73. Palmer, GC (2001) Neuroprotection by NMDA Receptor Antagonists in a Variety of Neuropathologies. *Curr Drug Targets* 2: 241-271
74. Parsons CG, Danysz W, Bartmann A, Spielmann P, Frankiewicz T, Hesselink M, Eilbacher B, Quack G (1999) Amino-alkyl-cyclohexanes are novel uncompetitive NMDA receptor antagonists with strong voltage-dependency and fast blocking kinetics: in vitro and in vivo characterization. *Neuropharmacology* 38: 85–108
75. Poeck K, Hacke W (2001) *Neurologie*, 11. Auflage. Springer, Berlin: 668-672
76. Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur EL, Tokito M, Mann E, Floeter MK, Bidus K, Drayna D, Oh SJ, Brown RH Jr, Ludlow CL, Fischbeck KH (2003) Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 33: 455-456
77. Puls I, Oh SJ, Sumner CJ, Wallace KE, Floeter MK, Mann EA, Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Vortmeyer A, Powers R, Finnegan K, Holzbaur EL, Fischbeck KH, Ludlow CL (2005) Distal spinal and bulbar muscular atrophy caused by dynactin mutation. *Ann Neurol* 57: 687-694
78. Rammes G, Schierloh A (2006) Neramexane – Merz Pharmaceuticals/Forest Laboratories. *J Drugs* 9: 128-135
79. Ravina BM, Fagan SC, Hart RG (2003) Neuroprotective agents for clinical trials in Parkinson's disease: a systematic assessment. *Neurology* 60: 1234-1240
80. Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Jr., Scott RW, Snider WD (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
81. Riviere M, Meininger V, Zeisser P, Munsat T (1998) An analysis of extended survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis treated with riluzole. *Arch Neurol* 55: 526-528
82. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, van den Bergh R, Hung W, Bird T, Deng G, Mulder DM, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GJ, Guselle JS, Horvitz HR, Brown HR Jr (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62
83. Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT (1990) Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28: 18-25
84. Sau D, Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L, Riso P, Guarnieri S, Porrini M, Simeoni S, Crippa V, Onesto E, Palazzolo P, Rusmini P, Bolzoni E, Bendotti C, Poletti A (2007) Mutation of SOD1 in ALS: a gain of a loss of function. *Hum Mol Genet* 16: 1604-1618
85. Schuetz B, Reimann J, Dumitrescu-Ozimek L, Kappes-Horn K, Landreth GE, Schurmann B, Zimmer A, Heneka MT (2005) The oral antidiabetic pioglitazone protects from neurodegeneration and amyotrophic lateral sclerosis-like symptoms in superoxide dismutase-G93A transgenic mice. *J Neurosci* 25: 7805-7812
86. Schwab C, Arai T, Hasegawa M, Yu S, Mc Geer PL (2008) Colocalization of transactivation-responsive DNA-binding protein 43 and huntingtin in inclusions of Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 67: 1159-1165
87. Schwarz J, Sharp PS, Dick JRT, Greensmith L (2005) The effect of peripheral nerve injury on disease progression in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 130: 897-910
88. Smittkamp SE, Brown JE, Stanford JA (2008) Time-course and characterization of orolingual motor deficits in SOD1-G93A mice. *Neuroscience* 151: 613-621
89. Snyder SH, Ferris CD (2000) Novel Neurotransmitters and their neuropsychiatric

- Relevance. *Am J Psychiatry* 157: 1738-1751
90. Stark H, Graßmann S, Reichert U (2000) Struktur, Funktion und potentielle therapeutische Bedeutung von NMDA-Rezeptoren. Architektur und Modulation der Rezeptoren. *Pharmazie in unserer Zeit* 29: 159-166
91. Stark H, Graßmann S, Reichert U (2000) Struktur, Funktion und potentielle therapeutische Bedeutung von NMDA-Rezeptoren. Therapiekonzepte und neue Rezeptorliganden. *Pharmazie in unserer Zeit* 29: 228-236
92. Stieber A, Gonatas JO, Gonatas NK (2000) Aggregates of mutant protein appear progressively in dendrites, in periaxonal processes of oligodendrocytes, and in neuronal and astrocytic perikarya of mice expressing the SOD1(G93A) mutation of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 177: 114-123
93. Sopala M, Frankiewicz T, Parsons CG, Danysz W (2000) Middle cerebral artery occlusion produces secondary, remote impairment in hippocampal plasticity of rats involvement of NMDA receptors? *Neuroscience Letters* 281: 143-146
94. Teuchert M, Fischer D, Schwalenstoecker B, Habisch HJ, Boeckers TM, Ludolph AC (2006) A dynein mutation attenuates motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mice. *Exp Neurol* 198: 271-274
95. Urushitani M, Tomoki, Nakamizo, Inoue R, Sawada H, Kihara T, Honda K, Akaike A, Shimohama S (2001) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated mitochondrial Ca^{2+} overload in acute excitotoxic motor neuron death: A mechanism distinct from chronic neurotoxicity after Ca^{2+} influx; *J Neurosci Res* 63: 377-387
96. Valentine JS, Hart PJ (2003) Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 100: 3617-3622
97. Van Damme P, Dewil M, Robbrecht W, Van den Bosch L (2005) Excitotoxicity and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegener Dis* 2: 147-159
98. Vargas MR, Johnson DA, Johnson JA (2011) Decreased glutathione accelerates neurological deficit and mitochondrial pathology in familial ALS-linked hSOD1(G93A) mice model. *Neurobiol Dis* 43: 543-551
99. Wang R, Zhang D (2005) Memantine prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Eur J Neurosci* 22: 2376-2380

100. Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, Miller TM, Baloh RH (2009) TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci* 106: 18809-18814
101. Wenk GL, Baker LM, Stoehr JD, Hauss-Wegrzyniak B, Danysz W (1998) Neuroprotection by novel antagonists at the NMDA receptor channel and glycine sites. *Eur J Pharma* 347: 183-187
102. Weydt P, Hong SY, Klot M, Moller T (2003) Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *Neuroreport* 14: 1051-1054.
103. Wiestler OD, Vajtai I, Wolf HK (1994) Pathologische Anatomie der Amyotrophe Lateralsklerose. Thieme, Stuttgart: 25-27
104. Wils H, Kleinberger G, Janssens J, Perenson S, Joris G, Cuijt I, Smits V, Ceuterick-de Groote C, van Broeckhoven C, Kumar-Singh S (2010) TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci* 107: 3858 - 3863

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Durchführung der Muskelkraftmessung der Vordergliedmaßen	24
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Muskelfaser	26
Abbildung 3: Ergebnis der Genotypisierung	28
Abbildung 4: Gewichtsentwicklung der weiblichen Tiere	30
Abbildung 5: Gewichtsverlauf der männlichen Tiere	31
Abbildung 6: Darstellung der Überlebenszeit der männlichen Tiere	34
Abbildung 7: Darstellung der Überlebenszeit der weiblichen Tiere	35
Abbildung 8: Grafische Darstellung der Laufradaktivität der weiblichen Tiere	36
Abbildung 9: Grafische Darstellung der Laufradaktivität der männlichen Tiere	39
Abbildung 10: Muskelkraft der Hinterbeine bei den weiblichen Tieren	42
Abbildung 11: Muskelkraft der Hinterbeine bei den männlichen Tieren	44
Abbildung 12: HE-Färbung des Musculus rectus femoris	46
Abbildung 13: Die Mittelwerte der Muskelfaserdurchmesser im Endstadium.	48

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primersequenz für die Genotypisierung der SOD1 ^{G93A} -Tiere	15
Tabelle 2: Protokoll für den Ansatz einer SOD1-PCR	16
Tabelle 3: PCR Programm für die SOD PCR	16
Tabelle 4: Orale Verbrauch an Wirkstofflösungen – männliche Tiere	29
Tabelle 5: Orale Verbrauch an Wirkstofflösungen – weibliche Tiere	29
Tabelle 6: Überlebenszeit - Deskriptive Statistik und Normalverteilung-männliche Tiere	32
Tabelle 7: Überlebenszeit - Deskriptive Statistik und Normalverteilung - weibliche Tiere	32
Tabelle 8: Überlebenszeitanalyse - männliche Tiere	33
Tabelle 9: Überlebenszeitanalyse – weibliche Tiere	33
Tabelle 10: Übersicht über die Auswertung der motorischen Aktivität- weiblichen Tiere	37
Tabelle 11: Übersicht über die Auswertung der motorischen Aktivität-männlichen Tiere	39

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die durch direktes oder indirektes Wirken zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Albert C. Ludolph für die unterstützende Heranführung des Themas und die große wissenschaftliche Freiheit, die er mir bei der Durchführung der Arbeit gelassen hat.

Gleichfalls bedanken möchte ich mich bei Dipl. Ing. Birgit Schwalenstöcker für die stete kritische Begutachtung meiner Ausarbeitung der Forschungsergebnisse sowie freundschaftliche Hilfestellungen.

Tanja Wipp und Stephen Meier unterstützten mich im richtigen Umgang mit den Tieren, leiteten mich im Tierstall zum selbständigen Arbeiten an und gaben Rat bei laborchemischen Fragen.

Helga Mogel und Dr. Hans-Jürgen Gdynia aus dem Muskellabor der Neurologie möchte ich für die Hilfe bei der Muskelhistologie und deren Auswertung danken.

Weiterhin möchte ich mich stellvertretend bei den Chefärzten Dr. M. Wiedemann und Dr. R. Rißel aus der unfallchirurgisch/orthopädischen Abteilung am Stauferklinikum Schwäbisch Gmünd für die Möglichkeit bedanken, die schriftlichen Ausarbeitung dieser Arbeit während der Zeit als Assistenzärztin zu komplettieren.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeitern am Institut für Epidemiologie und Medizinische Biometrie der Universität Ulm für die beratende Funktion.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Kollegen aus der Experimentellen Neurologie für die schöne Zeit am Eselsberg.

Ein herzliches Dankeschön geht an den Lektor und Theologe Christian Scherer am Max-Weber-Kolleg in Erfurt.

Mein besonderer Dank für die dauerhafte Unterstützung gilt insbesondere meinem Ehemann Christian Wagenfeld und meinen Eltern.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kerstin Wagenfeld, geb. Hähnel
Geboren am: 10. August 1981 in Leipzig
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1988 – 07/1992 Grundsule „Erich – Weinert“ in Wolfen
09/1992 – 06/2000 Gymnasium „Wolfen – Stadt“ in Wolfen
Abschluss: Abitur mit der Gesamtnote „gut“ (2.1)

Berufsausbildung

09/2000 – 09/2001 Ausbildung an der staatlichen Berufsfachschule für Krankenpflege am Bezirkskrankenhaus Günzburg in den Fachrichtungen Onkologie, Gynäkologie Chirurgie; Lehrkrankenhaus der Universität Ulm – Einjähriges Abschlusszeugnis „gut“ (1.9)

Hochschulausbildung

10/2001 – 03/2005 Vorklinisches Studium an der Universität Ulm (alte AO)
Abschluss: Physikum mit der Gesamtnote
04/2005 – 02/2008 Klinisches Studium an der Universität Ulm (neue AO)
02/2008 – 01/2009 Praktisches Jahr
04/2009 2. Staatsexamen (neue AO)

Promotion

09/2006 Prof. Dr. A. C. Ludolph, Ärztlicher Direktor der neurologischen Universitätsklinik Ulm - “ Der NMDA

Antagonist Neramexane im transgenen Mausmodell mit Amyotropher Lateralsklerose: Effekte auf Funktion und Überleben.“

Klinische Ausbildung

08/2005 – 09/2007	diverse Famulaturen in Ulm, Dessau, Erfurt und Günzburg
02/2008 – 06/2008	1. Tertiär PJ: Neurologie und neurologische Rehabilitation, Rehabilitationsklinik Valens (CH)
06/2008 – 10/2008	2. Tertiär PJ: Innere, Stauferklinikum Schwäbisch Gmünd
10/2008 – 01/2009	3. Tertiär PJ: Chirurgie, Stauferklinikum Schwäbisch Gmünd
07/2009 – 09/2010	Assistenzärztin Unfallchirurgie am Stauferklinikum Schwäbisch Gmünd mit Schwerpunkt Notfallambulanz (CA Dr. Wiedemann)
10/2010 – 03/2011	Assistenzärztin in der Pädiatrie am Stauferklinikum Schwäbisch Gmünd (CA Dr. Riedel)
03/2011 -	Assistenzärztin in der Wirbelsäulenchirurgie am Stauferklinikum Schwäbisch Gmünd (CA Dr. Riβel)

Weitere Qualifikationen

ab 2001	Kinder- und Erwachsenenbildung im Rahmen von Nachhilfetätigkeiten im Fach Englisch und Mathematik
ab 2003	Lehrbeauftragte für „LSM“- und „Erste-Hilfe“-Kurse bei der Deutschen Unfallhilfe GmbH
ab 2005	Lehrbeauftragte des DRK (Kreisverband Göppingen) Schulungen im Sanitätsdienst, Ausbildungen zum Rettungshelfer, -assistenten
ab 2006	ehrenamtliche HVO Tätigkeit (Helfer vor Ort)
ab 2008:	stv. Leiterin des „HVO-Systems“ im Landkreis Göppingen und Herausgeberin des online Newsletters pro Quartal aktives Mitglied in der AG „HvO“ des Landkreis Göppingen
ab 2009	beratende Funktion als Ärztin in der DRK Bereitschaft Hattenhofen

ab 2010	Trägerin des Bürgerpreises Baden-Württemberg – gestiftet von der Kreissparkasse Göppingen für Ehrenamt und soziales Engagement
ab 2011	Lehrfunktion an der Berufsfachschule für Gesundheits- und Krankenpflege Mutlangen, Schwerpunkt Neuroanatomie
ab 2012	Lehrfunktion an der DAA Schule für Physiotherapie in Schwäbisch Gmünd – Schwerpunkt Neurologie
Zertifikate:	Gebärdensprache Ernährungsmedizin Psychosomatische Grundversorgung