

**Effekte pharmakologischer Interventionen auf
Muskelatrophie im Mausmodell der amyotrophen
Lateralsklerose (ALS)**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Cathleen Drescher
aus Luckenwalde**

2016

Die Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe mit dem Forschungsschwerpunkt Kachexie und Innovative Klinische Studien unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan D. Anker an der Charité Universitätsmedizin Berlin sowie an der Universitätsmedizin Göttingen von April 2013 bis September 2016 angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Jochen Springer
Institut für Kardiologie und Pneumologie
Universitätsmedizin Göttingen

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
Institut für Biologie - Mikrobiologie
Freie Universität Berlin

Disputation am: 31. Januar 2017

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-------------|
| INHALTSVERZEICHNIS | III |
| ABKÜRZUNGEN | VII |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | IX |
| TABELLENVERZEICHNIS | XI |
| ZUSAMMENFASSUNG | XIII |
| ABSTRACT | XV |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Amyotrophe Lateralsklerose | 1 |
| 1.1.1 Grundlagen des Krankheitsbildes | 1 |
| 1.1.2 Ursachen..... | 2 |
| 1.1.3 Therapie..... | 6 |
| 1.2 Kachexie | 8 |
| 1.2.1 Definition..... | 8 |
| 1.3 Regulation des Kata- und Anabolismus | 9 |
| 1.3.1 Energiestoffwechsel | 9 |
| 1.3.2 Inflammation | 11 |
| 1.3.2.1 Zytokine | 12 |
| 1.3.3 Proteinstoffwechsel im Skelettmuskel | 13 |
| 1.3.3.1 Myostatin-Signalkaskade | 14 |
| 1.3.3.2 Akt-Signalkaskade | 18 |
| 1.3.3.3 Ubiquitin-Proteasom-System..... | 19 |
| 1.3.3.4 Apoptose..... | 22 |
| 1.3.3.5 Autophagie..... | 23 |
| 1.4 Beta-Blocker | 25 |
| 1.5 Zielsetzung | 27 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2 | MATERIAL UND METHODEN..... | 28 |
| 2.1 | Material..... | 28 |
| 2.1.1 | Reagenzien..... | 28 |
| 2.1.2 | Geräte und Materialien..... | 29 |
| 2.1.3 | Tiere..... | 30 |
| 2.1.4 | Medikamente | 31 |
| 2.1.5 | Lösungen | 31 |
| 2.1.6 | Fluorogene Substrate und ihre Inhibitoren..... | 32 |
| 2.1.7 | Antikörper..... | 32 |
| 2.1.8 | Computerprogramme | 34 |
| 2.2 | Methoden | 35 |
| 2.2.1 | Tierexperiment | 35 |
| 2.2.1.1 | Verwendete Mäusestämme..... | 35 |
| 2.2.1.1.1 | Das G93A-SOD1-Mausmodell | 35 |
| 2.2.1.1.2 | Weitere verwendete Mausstämme..... | 37 |
| 2.2.1.2 | Zucht..... | 37 |
| 2.2.1.3 | Haltungsbedingungen | 38 |
| 2.2.1.4 | Studiendesign | 39 |
| 2.2.1.5 | Medikamente und Gruppeneinteilung..... | 40 |
| 2.2.1.6 | Gewichtsermittlung..... | 41 |
| 2.2.1.7 | Ermittlung der Körperzusammensetzung | 42 |
| 2.2.1.8 | Tötung und Organentnahme | 42 |
| 2.2.2 | Molekularbiologische Methoden | 43 |
| 2.2.2.1 | Genotypisierung der Versuchstiere | 43 |
| 2.2.2.1.1 | DNA-Isolation von Mausschwanz- bzw. Ohrbiopsien | 43 |
| 2.2.2.1.2 | Quantifizierung von DNA | 43 |
| 2.2.2.1.3 | qPCR..... | 43 |
| 2.2.3 | Proteinbiochemie | 44 |
| 2.2.3.1 | Proteinextraktion aus Gewebe | 44 |
| 2.2.3.2 | Extraktion für Proteasom-Aktivitäts-Analyse..... | 45 |
| 2.2.3.3 | Extraktion für Caspase-Aktivitäts-Analyse | 45 |
| 2.2.3.4 | Quantifizierung von Proteinen | 45 |
| 2.2.3.5 | Ubiquitin-Proteasom-Aktivitäts-Analyse..... | 45 |
| 2.2.3.6 | Caspase-Aktivitäts-Analyse..... | 46 |
| 2.2.3.7 | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese | 46 |
| 2.2.3.8 | Western Blot | 47 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.2.3.9 | Immunnachweis von Proteinen | 47 |
| 2.2.3.10 | Antikörper-Ablösung..... | 48 |
| 2.2.3.11 | Messung von Inflammationsparametern..... | 48 |
| 2.2.3.12 | Histologie | 48 |
| 2.2.3.12.1 | Hämatoxylin Eosin Färbung | 49 |
| 2.2.3.12.2 | Vorbereitung der histologischen Rückenmark- und Gehirnschnitte...49 | |
| 2.2.3.12.3 | Detektion von Motoneuronen und Gliazellen | 51 |
| 2.2.3.12.4 | Mikroskopie und Auswertung | 52 |
| 2.2.4 | Statistische Auswertung | 52 |
| 3 | ERGEBNISSE..... | 53 |
| 3.1 | Verlaufsstudie - Phänotypische Charakterisierung der ALS/Kachexie..... | 53 |
| 3.1.1 | Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Muskelgewichte | 53 |
| 3.2 | Überlebensstudie - Behandlungseffekte auf die Entwicklung der ALS | 57 |
| 3.2.1 | Progression..... | 57 |
| 3.2.2 | Überleben | 61 |
| 3.2.3 | Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Muskelgewichte | 65 |
| 3.2.3.1 | Körpergewicht | 65 |
| 3.2.3.2 | Fettmasse | 66 |
| 3.2.3.3 | Fettfreie Masse | 68 |
| 3.2.3.4 | Muskelmasse | 69 |
| 3.3 | Vergleichsstudie - Behandlungseffekt 41 Tage nach Erstsymptomatik | 71 |
| 3.3.1 | Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Muskelgewichte | 71 |
| 3.3.1.1 | Körpergewicht | 71 |
| 3.3.1.2 | Fettmasse | 72 |
| 3.3.1.3 | Fettfreie Masse | 73 |
| 3.3.1.4 | Muskelmasse | 74 |
| 3.3.2 | Motoneuronenzahl | 76 |
| 3.3.2.1 | Anzahl von Motoneuronen im primären Motorcortex | 76 |
| 3.3.2.2 | Anzahl von Motoneuronen im lumbalen Rückenmark..... | 77 |
| 3.3.3 | Inflammation | 79 |
| 3.3.3.1 | Astrozyten im lumbalen Rückenmark | 79 |
| 3.3.3.2 | Mikrogliazellen im lumbalen Rückenmark | 80 |
| 3.3.3.3 | Zytokine im Blutplasma | 82 |
| 3.3.4 | Untersuchung der Atrophie im GC | 84 |
| 3.3.4.1 | Mikroskopische Untersuchung der Atrophie | 84 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.3.4.2 | Regulation des Proteinstoffwechsels im GC..... | 88 |
| 3.3.4.3 | Myostatin | 88 |
| 3.3.4.4 | Atrophiemarker | 91 |
| 3.3.4.5 | Akt-Signalkaskade | 93 |
| 3.3.4.6 | UPS | 97 |
| 3.3.4.6.1 | UPS-Aktivität | 97 |
| 3.3.4.6.2 | Ubiquitin-Proteinlevel..... | 98 |
| 3.3.4.7 | Apoptose..... | 99 |
| 3.3.4.7.1 | Caspase-Aktivität..... | 99 |
| 3.3.4.7.2 | Procaspase-3-Proteinlevel..... | 100 |
| 3.3.4.8 | Autophagie..... | 101 |
| 4 | DISKUSSION..... | 104 |
| 4.1 | Phänotypische Charakterisierung der Kachexie im ALS-Mausmodell | 104 |
| 4.1.1 | Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Muskelgewichte | 104 |
| 4.2 | Effekte der Pharmakotherapie auf das Überleben und den Phänotyp | 105 |
| 4.2.1 | ALS-Progression und Überleben..... | 105 |
| 4.2.2 | Körpergewicht, die Körperzusammensetzung und die Muskelgewichte..... | 107 |
| 4.2.3 | Einfluss auf die Anzahl der Motoneuronen | 109 |
| 4.2.4 | Effekt auf die Inflammation..... | 110 |
| 4.3 | Einfluss der pharmakologischen Behandlung auf die Muskelatrophie | 112 |
| 4.3.1 | Auswirkung der Behandlung auf die Muskelfaser-Verteilung..... | 112 |
| 4.3.2 | Behandlungseffekte auf katabole und anabole Mechanismen..... | 113 |
| 5 | LITERATUR..... | 121 |
| 6 | ANHANG | 148 |

ABKÜRZUNGEN

| Abkürzung | Bedeutung |
|------------------|--|
| 95%CI | Konfidenzintervall |
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| ABC | Avidin-Biotin-Complex |
| ActRIIB | Activin Rezeptor IIB |
| AKT | Protein Kinase B, Serin/Threonin Kinase |
| sALS, fALS | Sporadische oder familiäre amyotrophe Lateralsklerose |
| AMPK | Aminomonophosphat-abhängige Kinase |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATG12 | Autophagie bezogenes Protein 12 |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| β-ME | β-Mercaptoethanol |
| BAT | Braunes Fettgewebe (engl. <i>brown adipose tissue</i>) |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| C | Cytosin |
| °C | Grad Celcius |
| ChAT | Choline Acetyltransferase |
| d | Tag (engl. <i>day</i>) |
| D | Deutschland |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| dsDNA | Doppelstrang DNA (engl. <i>double strand</i>) |
| ssDNA | Einzelstrang DNA (engl. <i>single strand</i>) |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDL | <i>Musculus extensor digitorum longus</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>) |
| Fox | Engl. <i>Forkhead box</i> |
| G | Guanin |
| G93A | Aminosäuresubstitution von Glycin zu Alanin am Codon 93 |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase |
| GC | <i>Musculus gastrocnemius</i> |
| GDF-8 | Engl. <i>growth and differentiation factor-8</i> |

| | |
|----------------------------------|--|
| GFAP | Saures Gliafaserprotein (engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i>) |
| HR | <i>Hazard Ratio</i> |
| HRP | Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>) |
| IFN | Interferon |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL | Interleukin |
| ISA | Intrinsische sympathomimetische Aktivität |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| LC3 | Engl. <i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i> |
| MAFbx | Engl. <i>muscle atrophy F-box</i> |
| MK | Mikroskopie |
| mRNA | Messenger Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>) |
| MuRF1 | Engl. <i>muscle ring-finger protein 1</i> |
| MyoD | Myogener Faktor 3 |
| NaCl | Natriumchlorid |
| Na ₂ HPO ₄ | Dinatriumhydrogenphosphat |
| NMR | Kernspinresonanz (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>) |
| p-Wert | Wahrscheinlichkeits- oder Signifikanzwert (engl. <i>p=probability</i>) |
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>) |
| PGPH | Peptidyl-Glutamyl-Peptid-Hydrolase |
| RT | Raumtemperatur |
| qPCR | Quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>chain reaction</i>) |
| SDS-PAGE | Engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| SOD1 | Superoxid Dismutase 1 |
| SPF | Spezifisch pathogenfrei |
| T | Thymin |
| TA | <i>Musculus tibialis anterior</i> |
| Tab. | Tabelle |
| TBS | Tris gepufferte Salzlösung (engl. <i>tris buffered saline</i>) |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| WB | Western Blot |
| WT | Wildtyp |
| UK | Vereinigtes Königreich (engl. <i>United Kingdom</i>) |
| UPS | Ubiquitin-Proteasom-System |
| USA | Vereinigten Staaten von Amerika (engl. <i>United States of America</i>) |
| üN | Über Nacht |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Einleitung

| | |
|--|----|
| Abb. 1: ALS verursachende zelluläre Mechanismen..... | 5 |
| Abb. 2: Inaktivierende Myostatin (MSTN)-Genmutationen | 15 |
| Abb. 3: Die Myostatin-Signalkaskade | 17 |
| Abb. 4: Akt als zentraler Regulator der Proteinsynthese und –degradation | 18 |
| Abb. 5: Das Ubiquitin-Proteasom-System | 21 |
| Abb. 6: Extrinsischer und intrinsischer Signaltransduktionsweg der Apoptose..... | 23 |
| Abb. 7: Schematischer Ablauf der Autophagie | 24 |

Materialien und Methoden

| | |
|--|----|
| Abb. 8: Darstellung der neurologischen Bewertung des Krankheitszustandes..... | 37 |
| Abb. 9: Zuchtschema für die Erhaltung der G93A-SOD1-Mäuse | 38 |
| Abb. 10: Studiendesign. | 40 |
| Abb. 11: Versuchskomponenten für die Messung der Körperzusammensetzung | 42 |
| Abb. 12: Sektion des Rückenmarks der lumbal. Wirbelsäule und Querschnitt des Rückenmarks..... | 50 |
| Abb. 13: Querschnitt eines Mausgehirns | 50 |

Ergebnisse

| | |
|--|----|
| Abb. 14: Körpergewicht in der Verlaufsstudie | 54 |
| Abb. 15: Fettmasse in der Verlaufsstudie | 55 |
| Abb. 16: Fettfreie Masse in der Verlaufsstudie. | 56 |
| Abb. 17: Muskelgewichte in der Verlaufsstudie | 57 |
| Abb. 18: ALS-Progression von Stufe 1 zu 2 | 58 |
| Abb. 19: ALS-Progression von Stufe 1 zu 3..... | 60 |
| Abb. 20: Überleben (Kaplan-Meier-Kurve) nach Erstsymptomatik | 62 |
| Abb. 21: Veränderung (Δ) des Körpergewichtes in der Vergleichsstudie | 72 |
| Abb. 22: Veränderung (Δ) der Fettmasse in der Vergleichsstudie | 73 |
| Abb. 23: BAT-Gewicht in der Vergleichsstudie | 73 |
| Abb. 24: Veränderung (Δ) der fettfreien Masse in der Vergleichsstudie..... | 74 |
| Abb. 25: Anzahl von Motoneuronen im primä. Motorcortex in der Vergleichsstudie..... | 76 |
| Abb. 26: α -ChAT-Färbung vom primä. Motorcortex in der Vergleichsstudie | 77 |
| Abb. 27: Anzahl von Motoneuronen im lumbal. Rückenmark in der Vergleichsstudie .. | 78 |
| Abb. 28: α -ChAT-Färbung vom lumbal. Rückenmark in der Vergleichsstudie..... | 78 |
| Abb. 29: Anzahl von Astrozyten im lumbal. Rückenmark in der Vergleichsstudie | 79 |
| Abb. 30: α -GFAP-Färbung vom lumbal. Rückenmark in der Vergleichsstudie | 80 |

| | |
|--|----------|
| Abb. 31: Anzahl von Mikrogliazellen im lumbal. Rückenmark in der Vergleichsstudie | .81 |
| Abb. 32: RCA-1-Färbung vom lumbal. Rückenmark in der Vergleichsstudie |81 |
| Abb. 33: Zytokine im Blutplasma in der Vergleichsstudie |83 |
| Abb. 34: Querschnittsfläche der GC-Muskelfasern in der Vergleichsstudie |84 |
| Abb. 35: Größenverteil. der GC-Muskelfasern in Männchen in der Vergleichsstudie | ...85 |
| Abb. 36: HE-Färbung vom GC der Männchen in der Vergleichsstudie |86 |
| Abb. 37: Größenverteil. der GC-Muskelfasern in Weibchen in der Vergleichsstudie |87 |
| Abb. 38: HE-Färbung vom GC der Weibchen in der Vergleichsstudie |88 |
| Abb. 39: Myostatin-Signalkaskade im GC in der Vergleichsstudie |90 |
| Abb. 40: Western Blot-Abbildungen zur Analyse der Myostatin-Signalkaskade im GC in der Vergleichsstudie. |91 |
| Abb. 41: Atrophiemarker MuRF1 und MAFbx im GC in der Vergleichsstudie |92 |
| Abb. 42: Western Blot-Abbildungen zur Analyse der Atrophiemarker MuRF1 und MAFbx im GC in der Vergleichsstudie. |93 |
| Abb. 43: Akt-Signalkaskade im GC in der Vergleichsstudie |95 |
| Abb. 44: Western Blot-Abbildungen zur Analyse der Akt-Signalkaskade in der Vergleichsstudie |96 |
| Abb. 45: UPS-Aktivität im GC in der Vergleichsstudie. |98 |
| Abb. 46: Relativer Ubiquitin-Proteinlevel im GC in der Vergleichsstudie |99 |
| Abb. 47: Caspase-Aktivität im GC in der Vergleichsstudie |100 |
| Abb. 48: Relativer Procaspase-3-Proteinlevel im GC in der Vergleichsstudie |101 |
| Abb. 49: Behandlungseffekte auf die Autophagie im GC in der Vergleichsstudie |102 |
| Abb. 50: Western Blot-Abbildungen zur Analyse der Autophagie im GC in der Vergleichsstudie. |103 |

TABELLENVERZEICHNIS

Materialien und Methoden

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Reagenzien | 28 |
| Tab. 2: Geräte und Materialien | 29 |
| Tab. 3: Mausstämme..... | 30 |
| Tab. 4: Medikamente..... | 31 |
| Tab. 5: Lösungen | 31 |
| Tab. 6: Substrate und ihre Inhibitoren | 32 |
| Tab. 7: Primärantikörper..... | 32 |
| Tab. 8: Sekundärantikörper | 33 |
| Tab. 9: Computerprogramme | 34 |
| Tab. 10: Einordnung des Krankheitsverlaufes durch Ermittlung des neurologischen Zustands..... | 36 |
| Tab. 11: Verwendete Pharmazeutika, deren Wirkung und eingesetzte Dosen..... | 40 |
| Tab. 12: Gruppeneinteilung der Tiere in den Studien | 41 |
| Tab. 13: Primersequenzen für die Genotypisierung..... | 44 |
| Tab. 14: Protokoll für den Ansatz einer qPCR für die Genotypisierung..... | 44 |
| Tab. 15: Programm für die G93A-SOD1-qPCR | 44 |
| Tab. 16: Substrate zur Ermittlung der proteolytischen Aktivität im Ubiquitin-Proteasom-System | 46 |
| Tab. 17: Zusammensetzung Trenngel/Sammelgel | 47 |

Ergebnisse

| | |
|--|----|
| Tab. 18: Körpergewicht, Fettmasse und fettfreie Masse zu Beginn der Verlaufsstudie | 53 |
| Tab. 19: Ergebnisse der ALS-Progression von Stufe 1 zu 2 | 59 |
| Tab. 20: Ergebnisse der ALS-Progression von Stufe 1 zu 3 | 61 |
| Tab. 21: Ergebnisse der Überlebensanalyse nach Erstsymptomatik | 63 |
| Tab. 22: Ergebnisse der Überlebensanalyse nach Geburt..... | 64 |
| Tab. 23: Körpergewicht, Fettmasse und fettfreie Masse zu Beginn der Überlebensstudie..... | 65 |
| Tab. 24: Körpergewicht in der Überlebensstudie | 66 |
| Tab. 25: Fettmasse in der Überlebensstudie | 67 |
| Tab. 26: BAT-Gewicht in der Überlebensstudie..... | 68 |
| Tab. 27: Fettfreie Masse in der Überlebensstudie | 68 |
| Tab. 28: Muskelgewichte in der Überlebensstudie | 70 |

| | |
|---|----|
| Tab. 29: Körpergewicht, Fettmasse und fettfreie Masse zu Beginn der Vergleichsstudie | 71 |
| Tab. 30: Muskelgewichte in der Vergleichsstudie | 75 |

Anhang

| | |
|---|-----|
| Tab. 31: Auswertung der Muskelgewichte in der Verlaufsstudie | 148 |
| Tab. 32: Ergebnisse der Western Blot Analysen bezüglich der Myostatin- Signalkaskade vom GC in der Vergleichsstudie..... | 148 |
| Tab. 33: Ergebnisse der Western Blot Analysen bezüglich Atrophie vom GC in der Vergleichsstudie | 149 |
| Tab. 34: Auswertung der Ubiquitin Proteasom Aktivität im GC in der Vergleichsstudie | 149 |
| Tab. 35: Auswertung der Caspase-3 und 6-Aktivität im GC in der Vergleichsstudie .. | 150 |

ZUSAMMENFASSUNG

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist gekennzeichnet durch die Degeneration der oberen und unteren Motoneuronen, welche Kraftlosigkeit und Muskelatrophie verursacht. Die genaue Pathophysiologie der ALS-assoziierten Kachexie ist noch unbekannt. Derzeit ist nur Riluzol für die Behandlung von ALS zugelassen. In der vorliegenden Dissertation wurde die Kachexie bei der ALS näher charakterisiert und neue therapeutische Optionen in einem international standardisierten und etablierten Modell getestet. Unter Verwendung von männlichen und weiblichen transgenen G93A-Mäuse mit einer Mutation im Gen, das für die Superoxid-Dismutase (SOD1) kodiert ist, wurden die Auswirkungen verschiedener Beta-Blocker (10 mg/kg/d Propranolol, 20 mg/kg/d Oxprenolol, 10 oder 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol, 10 oder 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol) auf das Fortschreiten der Krankheit und das Überleben, im Vergleich zu Riluzol (Rilutek[®], 30 mg/kg/d), als positive Kontrolle, und Placebo getestet. In einer weiteren Studie wurden die Tiere zu einem definierten Endpunkt (medianes Überleben der kombinierten Placebogruppe aus der Überlebensstudie) euthanasiert. In dieser Vergleichsstudie wurde der Einfluss der Behandlung auf das Körpergewicht und -zusammensetzung, sowie auf die Motoneuronenzahl, die Inflammation sowie auf die Muskelatrophie untersucht. Neben Rilutek und Placebo wurden 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol, 10 und 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol verwendet, weil sie den größten positiven Einfluss in der vorangegangenen Überlebensstudie zeigten. Folgende Ergebnisse ergaben sich aus den Studien:

(1) Charakterisierung der Kachexie im G93A-SOD1-Mausmodell:

- Kachexie ist bei der ALS stark ausgeprägt. Die Untersuchungen der ALS-assoziierten Kachexie ergaben einen signifikanten Verlust des Körpergewichtes, der Fettmasse, einschließlich des braunen Fettgewebes, und der fettfreien Masse. Insbesondere die Skelettmuskelmasse nahm im Verlauf der Krankheit stark ab.

(2) ALS-Progression und Überleben:

- Durch die Behandlung mit beiden Dosen *R*- und *S*-Oxprenolol wurde die ALS-Progression von Stufe 1 zu Stufe 2 verzögert. Die 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol-Behandlung verlangsamte das Fortschreiten der ALS von Stufe 1 zu Stufe 3 am effektivsten. Das Überleben wurde durch 10 und 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol sowie 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol, versus Placebos, signifikant verlängert. Das Razemat Oxprenolol zeigte nur kleine positive Effekte und Rilutek sowie Propranolol besaßen, im Vergleich zu Placebos, keine positiven Effekte auf die ALS-Progression und das Überleben.

(3) Vergleichsstudie:

- 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und beide Dosen *S*-Oxprenolol (10 oder 20 mg/kg/d) reduzierten bei den Weibchen den Verlust an Körpergewicht, Fett und fettfreie Masse am stärksten. Der Gewichtsverlust des *Musculus gastrocnemius* (GC) und des *Musculus tibialis anterior* wurde bei den Weibchen durch die Behandlung mit den höheren Dosen *R*- und *S*-Oxprenolol (20 mg/kg/d) verringert. Die Wirkung der β -Blocker bei den Männchen scheint nicht so effektiv wie bei den Weibchen zu sein. Rilutek besitzt keinen Einfluss auf das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung sowie auf die Skelettmuskelmasse.
- Der Verlust der Motoneuronen wurde sowohl im primären Motorcortex als auch im lumbalen Rückenmark durch die Behandlung mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und beiden Dosen *S*-Oxprenolol (10 oder 20 mg/kg/d) reduziert. Es waren auch weniger Astrozyten und Mikrogliazellen im lumbalen Rückenmark vorhanden. Dennoch ergaben sich nur geringfügige Effekte auf den Zytokinlevel im Blutplasma.
- Die Muskelatrophie im GC wurde durch 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol bei den Männchen und durch 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol bei den Weibchen abgeschwächt. Der Muskelfaserquerschnitt und der Anteil an größeren Muskelfasern waren höher als bei den Placebos. Die runterregulierte Myostatin-Signalkaskade könnte eine Erklärung dafür sein. Die Analyse einiger Parameter der Akt-Signalkaskade, des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS), der Apoptose und der Autophagie ergaben einige positive Effekte auf das katabole und anabole Ungleichgewicht im GC.

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is caused by degeneration of upper and lower motoneurons resulting in weakness and muscle atrophy. The exact pathophysiology at ALS-associated cachexia is still unknown. Currently, only riluzole is approved for the treatment of ALS. In this dissertation, cachexia in ALS was characterized more in detail and novel therapeutic options in an internationally standardized and established model were tested. Using male and female transgenic G93A mice, with a mutation in the gene encoding the superoxide dismutase (SOD1), the effects of different beta blockers and doses (10 mg/kg/d propranolol, 20 mg/kg/d oxprenolol, 10 or 20 mg/kg/d *R*-oxprenolol, respectively, 10 or 20mg/kg/d, *S*-oxprenolol, respectively) on disease progression and survival in comparison to riluzole (Rilutek[®], 30mg/kg/d) as a positive control and placebo were tested. In another study, the animals were euthanized at a defined endpoint (median survival of combined placebo groups from the survival study). In this comparative study, the influence of treatment on body weight and body composition, as well as on motoneuron number, inflammation and on muscle atrophy was investigated. Besides using Rilutek and placebo, 20 mg/kg/d *R*-oxprenolol and 10 or 20 mg/kg/d *S*-oxprenolol were used because they have shown the greatest positive impact in the previous survival study. The following results were obtained:

(1) Characterization of cachexia in the G93A-SOD1 mouse model:

- Cachexia is strongly pronounced in ALS. The analyses of ALS-associated cachexia resulted in significantly body weight, fat mass, including the brown fat, and lean mass loss. In particular, the skeletal muscle mass loss was strongly increased during disease progression.

(2) Progression of ALS and survival:

- Treatment with both doses of *R*- and *S*-oxprenolol delayed ALS progression from score 1 to score 2. 20 mg/kg/d *S*-oxprenolol slowed most effective the progression of ALS from score 1 to score 3. Survival is significantly improved at 10 and 20 mg/kg/d *R*-oxprenolol and 20 mg/kg/d *S*-oxprenolol vs. placebo. The racemate oxprenolol only showed little positive effects and Rilutek as well as propranolol had no positive effects on ALS progression and survival compared to placebo.

(3) Comparative study:

- 20 mg/kg/d *R*-oxprenolol and both doses *S*-oxprenolol (10 or 20 mg/kg/d) reduced the loss of body weight, fat and fat-free mass most in female mice. The weight loss of the gastrocnemius muscle (GC) and the tibialis anterior muscle were lower by

treatment with the higher doses of *R*- and *S*-oxprenolol (20 mg/kg/d). In males, the effect of beta blockers seems to be not that effective as in the females. Rilutek has no effect on body weight and body composition as well as on skeletal muscle mass.

- The loss of motor neurons was reduced in the primary motor cortex and also in the lumbar spinal cord by treatment with Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-oxprenolol and the two doses of *S*-oxprenolol (10 or 20 mg/kg/d). There were also a fewer number of astrocytes and microglia in the lumbar spinal cord. However, only minor effects were seen on the cytokine level in the blood plasma.
- Muscle atrophy of the GC was attenuated through 20 mg/kg/d *R*-oxprenolol in males and through 20 mg/kg/d *S*-oxprenolol in females. The muscle fiber cross section and the proportion of larger muscle fibers were higher than in placebos. The down regulation of the myostatin signaling cascade might be an explanation for it. There were seen some positive effects on the catabolic and anabolic imbalance in GC muscle by analyzing some parameters of the Akt signaling cascade, the ubiquitin-proteasome system (UPS), apoptosis and autophagy.

1 EINLEITUNG

1.1 Amyotrophe Lateralsklerose

1.1.1 Grundlagen des Krankheitsbildes

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine neurodegenerative Erkrankung, bei der Motoneuronen im Gehirn und im Rückenmark geschädigt werden. Die Degeneration der Motoneuronen führt zur Einschränkung der willkürlichen Steuerung der Skelettmuskulatur. 1874 beschrieb der Neurologe Jean Martin Charcot erstmals das vollständige Krankheitsbild und gab der ALS ihren Namen. „Amyotroph“ bedeutet in dem Falle den Verlust der Muskelsubstanz (Muskelschwund), der in peripheren Motoneuronen hervorgerufen wird. „Lateralsklerose“ charakterisiert den Verlust von zentralen Motoneuronen in der motorischen Großhirnrinde, die eine Verbindung zum seitlichen Teil des Rückenmarks haben, wobei der Verlust zu einer Gewebsverhärtung führt. Demnach handelt es sich um eine Degeneration der beiden motorischen Neurone, d.h. des ersten (Motorcortex im Gehirn) und zweiten (Rückenmark) Motoneurons. Die Prävalenz der ALS liegt weltweit zwischen 2,7-7,4 pro 100 000 Einwohner und Jahr [1]. Verschiedene Studien zeigten, dass Männer im Durchschnitt häufiger betroffen sind als Frauen (Männer:Frauen=1,5:1) [2][3]. Das Durchschnittsalter von ALS-Patienten variiert von 50 bis 60 Jahren und nur ungefähr 5 % der Fälle zeigen einen Krankheitsausbruch im Alter von <30 Jahren (juvenile ALS-Form) [2]. Man unterscheidet eine sporadische ALS (sALS), die bei ungefähr 90-95 % der Betroffenen vorliegt, sowie eine familiäre ALS (fALS), die bei 5-10 % der Patienten vorkommt und häufig autosomal-dominant vererbt wird [4]. Die fALS und die sALS sind klinisch und neuropathologisch nicht zu differenzieren, wobei das Erkrankungsalter der fALS 10-14 Jahre früher ist als bei der sALS [5][6]. Die klassische ALS beginnt häufig an den Extremitäten. Bei etwa 10-15 % der Patienten kommt es im frühen Stadium überwiegend im Bereich der Fuß- und Wadenmuskulatur zu Muskelkrämpfen [7]. Oftmalig macht sich die ALS durch Veränderungen der Sprache wie Artikulationsprobleme, grammatische Fehler, eine reduzierte Sprechgeschwindigkeit, sowie durch Schluck- und Kaustörungen bemerkbar (bulbäre ALS-Form) [8]. ALS-Patienten besitzen einen modifizierten Energiestoffwechsel, der in einem drastischen Gewichtsverlust in der Spät-Phase der ALS und zur Entwicklung einer Kachexie (Definition siehe Punkt 1.2) führt [9]. Im Krankheitsverlauf entwickelt sich bei fast allen Patienten eine respiratorische Insuffizienz, die durch eine starke Atrophie in der Atemmuskulatur hervorgerufen wird und letztlich die hauptsächliche Todesursache von ALS darstellt [10]. Frühe Symptome einer respiratorischen Insuffizienz sind nächtliche

Schlafstörungen, morgendliche Kopfschmerzen sowie Tagesmüdigkeit und Konzentrationsstörungen. ALS-Patienten zeigen oftmals psychiatrische Symptome und demenzielle Entwicklungen [11]. Es wurden schon affektive Störungen bis hin zu manisch depressiven Bildern [11] als auch Halluzinationen beschrieben [12]. Eine Depression entwickeln etwa 10 % der Patienten [13]. ALS-Patienten, die Begleiterscheinungen wie Hoffnungslosigkeit, Depressionen und mentalen Stress aufzeigen, besitzen eine kürzere Überlebenszeit [14]. Im Umkehrschluss wird eine positive Stimmung mit 6 Monate längerem Leben assoziiert [15]. Eine Verbindung zwischen der frontotemporalen Demenz (FTD) und ALS wurde bereits schon vor dem zweiten Weltkrieg gezeigt [12]. Eine sichere Verknüpfung zwischen der FTD und der ALS kommt bei etwa 5-10 % aller Patienten vor [16]. Weiterhin können Veränderungen der Okulomotorik auftreten. Bereits 1982 wurden erstmals reduzierte Sakkaden und eine reduzierte Geschwindigkeit bei Augenfolgebewegungen in der Elektroofokulographie festgestellt [17]. Eine im Jahr 2015 veröffentlichte Studie mit 68 ALS-Patienten zeigte, dass insgesamt 37 Patienten (54,4 %) okulomotorische Auffälligkeiten besaßen [18]. In einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass mehr als die Hälfte der untersuchten ALS-Patienten extrapyramidale Symptome aufwiesen [19]. Durch diese Störungen im Bewegungsablauf kommt es bei den Patienten häufig zu Ataxie, Tremor, einer gestörten Einleitung einer Bewegung oder zur gesteigerten Fallneigung [20]. Des Weiteren wurde im Bereich der Sensibilität beobachtet, dass in spinalen ALS-Patienten atypische Werte für die Schmerzempfindung vorlagen [21].

1.1.2 Ursachen

Zur ALS kommt es durch überladene schädliche Proteinablagerungen in Motoneuronen. Dieser Prozess wird als Proteinopathie bezeichnet. Die Proteinaggregate entstehen unter anderem durch Mutationen in bestimmten Genen. Die ALS ist eine sehr komplexe genetische Erkrankung, bei der eine große Anzahl von Genen beteiligt ist. Bis zum heutigen Tage sind 21 chromosomale Regionen mit 19 identifizierten Genen, die mit ALS assoziiert sind, entdeckt worden [22]. Mutationen in der Cu/Zn Superoxid Dismutase 1 (SOD1) sind seit 1993 als Ursache bei 15-20 % der fALS-Familien und 1-2 % der sALS bekannt [6][23]. Mehr als 150 ALS-assoziierte SOD1-Mutationen wurden bisher beschrieben [24]. Im Allgemeinen katalysiert die SOD1 die Dismutation der Superoxid-Anion-Radikale, was zur Bildung von Wasserstoffperoxid führt. Die SOD1 bindet ein Kupfer und ein Zink Atom, welche die Katalyse unterstützen. Ist die Umwandlung der reaktiven Radikale durch die SOD1 gestört, kann das Genom durch den hervorgerufenen oxidativen Stress geschädigt werden [6][25]. Mutationen im SOD1-Gen führen auch zu mitochondrialen Defekten

[26], die in einer erhöhten Zellschädigung bzw. Apoptose durch freie Sauerstoff- und Stickstoffradikale resultiert. In den letzten Dekaden konnten weitere SOD1-Pathomechanismen identifiziert werden, die wahrscheinlich ursächlich für ALS sind. Dazu gehören u.a. eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums, die zur vermehrten Aktivierung von Glutamatrezeptoren und somit zu einer Exzitotoxizität führt [27][28] oder eine erhöhte Mikrogliaaktivierung und damit einhergehend die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen [29], sowie Störungen des axonalen Transports [29][30]. Das G93A-SOD1-Mausmodell ist das am meisten untersuchte ALS-Tiermodell [31]. 2011 wurde bekannt, dass eine Mutation im *chromosome 9 open reading frame 72* (C9ORF72)-Gen ALS verursacht [32]. Seither gilt die Mutation im C9ORF72, die in 40-50 % der fALS-Patienten und zu ~10 % bei sALS-Patienten zu finden ist [33], neben den SOD1-Mutationen, als die meist vorkommende genetische Ursache der ALS [23]. Mutationen im C9ORF72-Gen stehen im Verdacht Defekte im RNA-Metabolismus zu erzeugen [34]. Des Weiteren werden Mutationen im *Fused in sarcoma* (FUS)-Gen und im *transactivation response DNA-binding protein* (TARDBP)-Gen einer pathologischen Rolle bei der ALS-Entwicklung zugeschrieben. Mutationen im FUS-Gen kommen in 3-5 % der fALS und in ~1 % der sALS vor [35][36]. Durch FUS-Gen Mutationen entstehen mRNA und transkriptionelle Defekte [37]. Im Vergleich zu SOD1-Patienten besitzen FUS-charakterisierte ALS-Patienten ein früheres Erkrankungsalter, sowie eine schnellere Progression und es kommen mehr Fälle der bulbären ALS-Form vor [38]. Mutationen im TARDBP-Gen, welches das Protein TDP-43 codiert, sind für 4 % der fALS und ~1 % der sALS verantwortlich [39][40]. Mutationen im TARDBP-Gen sind vermutlich ebenfalls für einen defekten RNA-Metabolismus verantwortlich [41] als auch für Defekte an Mitochondrien [42] in ALS-Patienten. Patienten mit TARDBP-Mutationen entwickeln einen typischen ALS-Phänotyp mit Störungen der Extremitäten oder Anzeichen von bulbären Veränderungen [43]. Darüber hinaus existieren andere genetische Mutationen, die im Verdacht stehen an der fALS-Entwicklung beteiligt zu sein. Mutationen im Alsin-Gen beispielsweise führen vornehmlich zu der juvenilen ALS-Form, die in diesem Zusammenhang bislang in 50 Patienten beobachtet wurde [44]. Alsin-Mutationen führen vermutlich zu Störungen im Vesikeltransport und missgefalteten Proteinen in Neuronen [45][46]. ALS-verursachende Defekte im Vesikeltransport wurden auch aufgrund von Genmutationen im *vesicle associated membrane protein B* (VAPB) [47] und *valosin-containing protein* (VCP) [48] beobachtet. Außerdem wurden Zusammenhänge mit vermehrter Apoptose durch Mutationen im VAPB- [49] und VCP-Gen [50] festgestellt. Mutationen im VCP-Gen bewirken anscheinend auch Proteinakkumulationen [48], die mit der Entstehung der fALS assoziiert sind. 2012 wurde bekannt, dass es durch Genmutationen im Ubiquilin 2

(UBQLN2) zu einer erhöhten Anzahl an ALS-assoziierten Proteinakkumulationen kommt [51]. Zur Ausbildung einer juvenilen fALS kommt es auch aufgrund von Mutationen im Senataxin (SETX)-Gen [52], welche vermutlich Defekte in der Transkriptionsmaschinerie nach sich ziehen [53]. ALS kann vermutlich durch Spatacsin 11 (SPG11)-Genmutationen ausgelöst werden [54], was in einer Störung im axonalen Transport resultieren kann [55]. Eine gestörte Angiogenese [56] als auch ein defekter RNA-Metabolismus [57] werden mit Mutationen im Angiogenin-Gen (ANG) assoziiert, welche als Ursache für die fALS im Jahr 2007 identifiziert wurden [58]. Genmutationen im *sigma non opioid intracellular receptor 1* (SIGMAR1)-Gen [59], *factor induced gene 4* (FIG4) [60], Optineurin (OPTN) [61] oder Profilin 1 (PFN1) [62] sind eher selten bei fALS-Patienten zu finden. SIGMAR-Mutationen scheinen den Stoffwechsel zu stören [59] und FIG4-Genmutationen führen zur vermehrten Apoptose von Neuronen [63], wohingegen PFN1-Mutationen zu Defekten im Zytoskelett führen [62]. Mutationen im OPTN-Gen beeinflussen die Autophagie [64]. Die Ursache für sALS ist in den meisten Fällen unklar, aber fALS Gene wie SOD1, C9ORF72, FUS oder TARDBP wurden ebenso in einigen sALS Patienten gefunden [30]. Akkumulation von Neurofilamenten ist ein pathoanatomisches Merkmal der ALS, welches in einer axonalen Dysfunktion resultieren kann. Tatsächlich wurden in Patienten mit sALS genetische Varianten der *neurofilament heavy subunit* (NEFH) identifiziert, die mit der Entstehung von ALS assoziiert sind [65]. In Mausmodellen konnte in histologischen Untersuchungen die Akkumulation der Neurofilamente bestätigt werden [66]. Neben NEFH konnten Peripherin (PRPH)-Genmutationen in Verbindung mit axonaler Dysfunktion bei sALS-Patienten beobachtet werden [67]. Ein vermutliches Risikogen für die sALS ist das Survival Motoneuron (SMN)-Gen. In einer Studie konnte bei 16 % der sALS-Patienten Deletionen im SMN2-Gen festgestellt werden, welche Defekte im RNA-Metabolismus auslösen können [68]. Mutationen in den homologen Genen der Paraoxonase (PON) werden schon seit 2006 im Zusammenhang mit der Entstehung der sALS assoziiert [69]. 2010 wurden dann in einer Studie 7 PON-Gen Mutationen in fALS und sALS-Patienten identifiziert [70]. Es wird angenommen, dass PON-Gene eventuell einen neuroprotektiven Effekt gegen oxidativen Stress besitzen, der durch die Mutationen verloren geht [71]. Genmutationen im Progranulin (PGRN)- [72], *vascular endothelial growth factor* (VEGF)- [73], *apurinic endonuclease* (APEX1)- [74], Ataxin-2 (ATXN2)- [75] als auch *chromatin modifying protein 2B*-Gen (CHMP2B) [76] gelten als Risikofaktoren ALS zu bekommen, wobei die aktuelle Datenlage jedoch umstritten ist. In Abbildung 1 werden alle beschriebenen Mechanismen, die zu ALS führen können, mit den putativ assoziierten Genmutationen schematisch zusammengefasst.

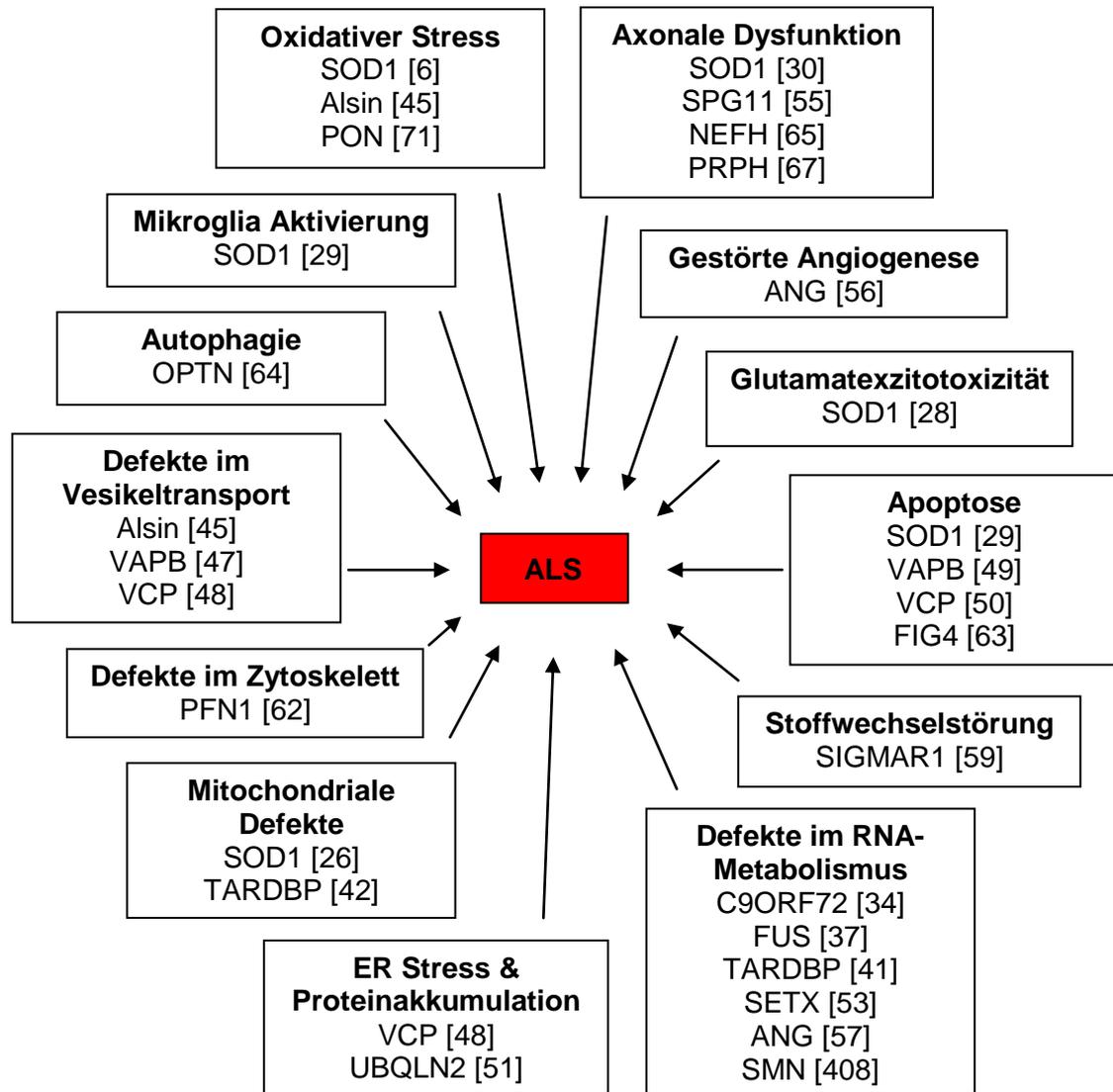


Abbildung 1: ALS verursachende zelluläre Mechanismen mit putativ assoziierten Genmutationen; Abkürzungen: Angiogenin (ANG), *apurinic endonuclease* (APEX1), *chromosome 9 open reading frame 72* (C9ORF72), Endoplasmatisches Retikulum (ER), *factor induced gene 4* (FIG4), *fused in sarcoma* (FUS), *neurofilament heavy subunit* (NEFH), Optineurin (OPTN), Paraoxonase (PON), Peripherin (PRPH), Profilin 1 (PFN1), Senataxin (SETX), *survival motor neuron* (SMN), Superoxid Dismutase 1 (SOD1), Spatacsin (SPG), *TAR DNA binding protein 43* (TARDBP), Ubiquilin 2 (UBQLN2), *vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C* (VAPB), *valosin-containing protein* (VCP)

Gegenwärtig wird zunehmend angenommen, dass es zur Ausbildung der sALS aufgrund des Zusammenspiels der genetischen Variablen mit Umweltfaktoren und der Lebensweise der Patienten kommt. Dabei spielen landwirtschaftliche Chemikalien wie Pestizide oder Herbizide eine wesentliche Rolle. So konnte in zwei Studien zuverlässig gezeigt werden, dass das Risiko an sALS zu erkranken mit der Pestizidbelastung in Verbindung steht [77]. Weiterhin wird ein erhöhtes Bleivorkommen als Ursache für die sALS angesehen. Es wurden höhere Level an bestimmten Metallen im Blut, im Knochen, im Urin, im Rückenmark und auch in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit

(engl. *cerebrospinal fluid*, CSF) in sALS-Patienten, im Vergleich zu Kontrollen, gefunden [78]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass mutmaßlich eine Verbindung zwischen der Entstehung von sALS und dem Rauchen von Zigaretten besteht [79][80][81]. Wang *et al.* [82] konnten zeigen, dass Raucher ein höheres Risiko besitzen ALS zu entwickeln, als solche, die noch nie geraucht haben. Dabei ist es egal ob sie mal Raucher waren oder immer noch Raucher sind. Andere Risikofaktoren für die sALS können zum Beispiel auch Kopf- bzw. Hirnverletzungen sein. Anlass dieser Annahme war eine Untersuchung von u.a. American Football Spielern, die ein höheres Vorkommen von sALS-Fällen aufwiesen [83]. Ebenso gibt es die Meinung, dass exzessives körperliches Training, das Risiko sALS zu bekommen, erhöht. Eine Studie mit professionellen Fussballspielern aus Italien, die regelmäßig ein hohes Ausmaß an sportlichen Training absolvieren, ergab für die Spieler ein höheres Risiko an sALS zu erkranken [84]. Eine andere Studie mit professionellen Radfahrern und Basketballspielern, die ebenfalls regelmäßig körperlichen Anstrengungen ausgesetzt sind, zeigte jedoch keinerlei Verbindung ALS zu entwickeln [85]. Diese Beispiele zeigen, dass noch weitere Studien erforderlich sind.

1.1.3 Therapie

Die Aufklärung der oben beschriebenen pathologischen Mechanismen soll zur Entwicklung neuer Therapien gegen ALS beitragen. Zum einen soll die Therapie das Fortschreiten der ALS verlangsamen (kausale bzw. neuroprotektive Therapie) und zum anderen sollen die Beschwerden der Patienten im Alltag gelindert werden (palliative Therapie), um die Lebensqualität zu erhalten.

Bis zum heutigen Tage gibt es nur ein durch die *US Food and Drug Administration* (FDA) und *European Medicines Agency* (EMA) zugelassenes Medikament gegen die ALS. Dabei handelt es sich um Riluzol (Rilutek[®]) oder auch 6-(trifluormethoxy)-2-aminobenzothiazol. In zwei Placebo-kontrollierten Studien konnte das Überleben der Patienten um etwa drei Monate verlängert, jedoch nicht die Lebensqualität verbessert werden [86][87]. Rilutek wirkt als antiglutamaterge Substanz. Glutamat ist einer der wichtigsten Neurotransmitter im zentralen Nervensystem und ist für die Weiterleitung von Nervenimpulsen auf benachbarte Nervenzellen zuständig. Wird jedoch zu viel Glutamat in den synaptischen Spalt zwischen zwei Nervenzellen ausgeschüttet, so kann es zu nachgeschalteten toxischen Effekten kommen, was zum Absterben der Nervenzellen bzw. bei der ALS vor allem der Motoneuronen führt. Genau hier setzt die Therapie mit Rilutek an. Rilutek vermindert die Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt, beugt die Unterfunktion von Glutamatrezeptoren vor und erhöht die Wiederaufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt durch die Aktivierung von Glutamatrezeptoren in Gliazellen [88][89]. Außerdem ist Rilutek ein

Natriumkanalblocker. Es hemmt den unkontrollierten Einstrom von Natriumionen und indirekt von Kalziumionen. Durch das exzessive Einströmen der Ionen wird die extrazelluläre Freisetzung von Glutamat im präsynaptischen Neuron gefördert und darüber hinaus führt der Natrium- und Kalziumioneneinstrom im postsynaptischen Neuron zum Zelltod und axonalen Schädigungen [90]. In den letzten Dekaden wurden vielversprechende Daten in transgenen ALS-Mausmodellen geliefert, die aber mit klinischen Studien nicht reproduziert werden konnten [91]. Antioxidantien wie Vitamin E, N-acetyl-L-cystein (NAC) oder Katalase zeigten zwar positive Effekte in mutierten SOD1 (mSOD1)-Mausmodellen, konnten aber keine Erfolge in klinischen Studien vorweisen [92]. Auch die Behandlung mit anti-inflammatorischen Medikamenten wie Minocyclin, was das Überleben der Mäuse im mSOD1-Modell enorm verlängerte [93], zeigte keine signifikante Verbesserung in ALS-Patienten [94]. Natürliche Produkte, wie Kaffeesäure-Phenethyl-Ester (engl. *caffeic acid phenethyl ester*, CAPE), das antioxidativ und anti-inflammatorisch wirkt [95], besitzen ebenso großes Potenzial ALS effektiv zu behandeln [96]. Es wurde publiziert, dass durch die Behandlung mit CAPE nur 10 % der Motoneuronen starben, im Gegensatz zur Vehikel-behandelten Gruppe, bei der 58 % der Motoneuronen degenerierten. Außerdem konnte eine verminderte Inflammation beobachtet werden [97]. Neben der medikamentösen Therapie scheint die Gentherapie ebenfalls ein vielversprechender Ansatz gegen die ALS zu sein. Dadurch können Gene, die für anti-apoptische Proteine oder auch neurotrophe Faktoren codiert sind, mithilfe von viralen Vektoren direkt ins Zentralnervensystem oder in den Muskel verabreicht werden [98]. Bisweilen konnte ein Erfolg der Gentherapie unter anderem durch intramuskuläre Injektionen vom lentiviral-markierten *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder des anti-apoptotisch wirkenden *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) in Mausmodellen erzielt werden [99][100]. Eine andere Alternative ist die Expression von Genen, die für die Degeneration von Motoneuronen ursächlich sind, zu blocken. Im Mausmodell und auch bereits in einer 2013 gestarteten klinischen Studie (Phase I) konnte die Genexpression des mSOD1-Gens durch *small interfering RNA* (siRNA) geblockt werden [101][102]. In den letzten 10 Jahren rückte in ALS-Mausmodellen die Stammzelltherapie immer mehr in den Fokus. Hierbei wurden Zelltypen wie embryonale, neurale, hämatopoetische oder auch mesenchymale Stammzellen (MSCs) sowie Knochenmarkszellen transplantiert [103]. Unter anderem wurden in SOD1-Mäusen humane MSCs intravenös injiziert, die dann erfolgreich differenzierten und zum Gehirn sowie zum Rückenmark wanderten und dort auch für lange Zeit überlebten, was nachweislich eine signifikante Verzögerung des Krankheitsausbruchs und des -verlaufes sowie eine erhöhte Lebensdauer bewirkte [104]. Eine sichere MSC-Transplantation wurde sogar schon mit Erfolg bei ALS-

Patienten durchgeführt, wobei aber zu erwähnen ist, dass die ALS-Entwicklung nicht verzögert wurde [105][106]. Gerade weil es noch kein anderes Mittel als Rilutek gegen ALS gibt, ist es umso wichtiger die Lebensqualität der Patienten auch in fortgeschrittenen Krankheitsstadien zu erhalten. Muskelkrämpfe treten bereits frühzeitig im Krankheitsverlauf auf und können anfangs physiotherapeutisch und später auch medikamentös behandelt werden. Ein vermehrter Speichelfluss kann mit anticholinergen Mitteln entgegengewirkt werden. Bei Schluckstörungen sollten zunächst eine Ernährungsberatung und eine Anpassung der Nahrung erfolgen. Im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf wird die Kommunikation sehr eingeschränkt [107]. Deshalb muss frühzeitig mit einer logopädischen Therapie begonnen werden. Später kann auch ein Kommunikator eingesetzt werden. Immobilität, allgemeine Schwäche und Muskelatrophie führen zu erheblichen Schmerzen, welche sich in etwa einem Viertel der ALS-Patienten in Schulterschmerzen äußern [108]. Hier können Physio- und Ergotherapie sowie anti-inflammatorische Mittel Abhilfe schaffen. Desweiteren sollten Stürze, die vermehrt bei der ALS auftreten, vorgebeugt werden [109]. Motorisierte Rollstühle steigern zum einen die Mobilität als auch die Fall-Sicherheit der Patienten. Die respiratorische Insuffizienz kann initial durch nicht-invasive Maskenbeatmung therapiert werden, welche das Überleben der Patienten verlängert und auch die Lebensqualität verbessert [110]. Sollte die nicht-invasive Maskenbeatmung nicht mehr helfen, besteht die Möglichkeit der invasiven Beatmung über ein Tracheostoma. Durch die verschlechterte Lebensqualität bei fortschreitender Krankheit kommt es vermehrt zu Depressionen und Angstzuständen, die mit Antidepressiva behandelt werden sollten.

1.2 Kachexie

1.2.1 Definition

Kachexie definiert sich durch einen 5%igen Verlust des Körpergewichtes innerhalb von 12 Monaten oder durch einen *Body-Mass-Index* (BMI) von weniger als 20 kg/m² in Gegenwart von chronischen Krankheiten. Darüber hinaus liegen in der Regel drei der folgenden fünf Kriterien vor: verminderte Muskelkraft, Müdigkeit, Appetitlosigkeit, ein niedriger fettfreie Masse-Index, der Anstieg von Entzündungsmarkern wie C-reaktives Protein oder Interleukin (IL)-6 sowie Anämie oder niedrige Albumin Serumwerte [111]. Kachexie kommt bei chronischen Krankheiten wie Krebs, chronischer Herzinsuffizienz (engl. *chronic heart failure*, CHF), chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD), chronische Nierenerkrankung (engl. *chronic kidney disease*, CKD), zystische Fibrose, Leberzirrhose, Morbus Crohn, rheumatoider Arthritis (RA), Schlaganfall, Malaria sowie Tuberkulose und eben auch

bei der ALS vor [9][112][113][114]. Die genaue Pathophysiologie bei ALS-assoziierte Kachexie ist bisher nicht bekannt. Bei der Kachexie geht der Gewichtsverlust hauptsächlich mit dem Verlust an Skelettmuskelmasse mit oder ohne Verlust von Fettmasse einher [111]. Pro-inflammatorische Zytokine, wie *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), IL-1 und IL-6 werden seit langem als Mediator der Kachexie betrachtet, obwohl deren Rolle beim Muskelschwund umstritten bleibt (siehe Abschnitt 1.3.2). Durch den Verlust an Muskelmasse kommt es zu einer verminderten Muskelkraft. Die Patienten entwickeln eine geringere körperliche Aktivität und Bewegungsunlust, was oftmals eine reduzierte Lebensqualität verursacht [115]. Durch diese Faktoren werden zusätzlich die Morbidität und Mortalität bei kachektischen Patienten erhöht [116]. Umso wichtiger ist es neue Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln, die die Körperzusammensetzung dahingehend verändern, dass das Leben der Patienten verbessert und verlängert wird.

1.3 Regulation des Kata- und Anabolismus

Bei der ALS kommt es zu einem Ungleichgewicht des Kata- und Anabolismus. Dabei wird der Energie- sowie Proteinstoffwechsel gestört und eine Inflammation induziert, was eine Muskelatrophie und Kachexie hervorrufen kann.

1.3.1 Energiestoffwechsel

Ein ausgewogenes Energieverhältnis ergibt sich aus einem Gleichgewicht der Energieaufnahme und des -verbrauchs. Bei gesunden Menschen führt diese Bilanz zur Energiespeicherung und zu einem stabilen BMI. ALS-Patienten hingegen sind meist dünn und weisen einen normalen bis niedrigen BMI (unter 18,5 kg/m²) auf, welcher in einem 7,7-fach erhöhten Todesrisiko, im Vergleich zu Normalgewichtigen, resultiert [117]. Eine schwere Kachexie mit einem Gewichtsverlust von >10 %, die bei ~25 % aller Krebspatienten vorkommt, ist ebenfalls mit einer reduzierten Lebensdauer assoziiert [118]. Die ALS führt bei den Patienten zum Verlust von Körpergewicht und Fettmasse während des Krankheitsverlaufes, weswegen die Energiespeicher reduziert sind [119]. Erschwerend kommt hinzu, dass den ALS-Patienten aufgrund der bulbären Probleme die Nahrungsaufnahme erschwert wird und sie deshalb oftmals eine Unter- bzw. Mangelernährung entwickeln [120]. Appetitlosigkeit, Dehydrierung und limitierte körperliche Aktivität tragen ebenfalls zu einer reduzierten Energiespeicherung bei [121]. Es wurde zusätzlich gezeigt, dass der Energieverbrauch im Ruhezustand (engl. *resting energy expenditure*, REE) bei fALS als auch bei sALS-Patienten erhöht ist [122] [123]. Dieser Hypermetabolismus tritt in ungefähr 50 % aller ALS-Patienten auf [124]. Eigentlich würde man vermuten, dass im Verlauf der Krankheit durch die Muskelatrophie und den Verlust an Muskel- sowie Fettmasse der Energieverbrauch

gesenkt wäre [124]. Der erhöhte Energieverbrauch könnte womöglich auf die unkontrollierten Faszikulationen [119], den erhöhten Arbeitsaufwand der Atemmuskulatur [125] oder die mitochondriale Dysfunktion [126] zurückzuführen sein. Zu ähnlichen metabolischen Veränderungen kommt es auch bei der tumorinduzierten Kachexie. Auch hier erhöht sich der REE und durch die Muskelatrophie in kachektischen Patienten kommt es zu einem verringerten spontanen Energieaufwand, der aber nicht den gesteigerten REE ausgleichen kann, was auch hier in einen Hypermetabolismus resultiert [127]. Fettgewebe ist der Energiehauptspeicher im Körper. Im Falle eines Energieüberschusses wird die Energie in Form von Triacylglyceriden in Adipozyten im weißen Fettgewebe (engl. *white adipose tissue*, WAT) gespeichert (Lipogenese) und bei einem Energiemangel werden die Lipide zu einem Molekül Glycerin und drei Molekülen von freien Fettsäuren abgebaut (Lipolyse) [128]. Neben dem WAT existiert auch noch das braune Fettgewebe (engl. *brown adipose tissue*, BAT), das vornehmlich der Thermogenese dient. Bei ALS-Patienten kommt es zu einer Art Fettumverteilung, d.h. die Patienten verlieren subkutanen Fettgewebe, während sie mehr Bauchfett entwickeln, wobei bekannt ist, dass die Menge an subkutanem Fettgewebe mit dem Überleben der ALS-Patienten positiv korreliert [129]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Körperfettanteil vor der ALS-Diagnose mit einem reduzierten Risiko an ALS zu sterben, assoziiert ist [130]. Hyperlipidämie [131] und eine erhöhte Konzentration an zirkulierendem Apolipoprotein E (ApoE) [132] im Blut korrelieren positiv mit dem Überleben in ALS-Patienten, was vermuten lässt, dass die Verfügbarkeit an Lipiden im Blut von Vorteil zu sein scheint. Darüber hinaus scheint eine erhöhte kohlenhydratreiche Ernährung und eine geringe Aufnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit einer erhöhten ALS-Prävalenz assoziiert zu sein [133]. Interessanterweise scheint die ALS bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 später zu beginnen [134]. Wurden mSOD1-Mäuse mit hochkalorischen Futter ernährt, verzögerte sich der Krankheitsbeginn, die Lebensdauer wurde erhöht, die Muskeldenervation reduziert und das Motoneuronen-Überleben verbessert [135]. Im Umkehrschluss beschleunigte kalorienarme Nahrung den ALS-Krankheitsverlauf in mSOD1-Mäusen [136]. Dennoch ist bis zum heutigen Tage unklar, welche die beste Ernährungsweise ist, um sich vor ALS zu schützen oder den Krankheitsverlauf zu verändern [137]. Bei der tumorinduzierten Kachexie kommt es ebenfalls zu einem vermehrten Abbau von Fett (WAT) [138]. Kachektische Magen-Darm-Krebspatienten wiesen in einer Studie signifikant weniger viszerales Fett, im Vergleich zu Kontrollpatienten, auf [139]. Bei Patienten mit Lungenkrebs wurde sogar ein Verlust von bis zu 85 % Körperfett festgestellt [140]. Die Fettgewebeabnahme bei der

Kachexie beeinflusst nicht nur die Lipidreserven, sondern stört auch den Metabolismus sowie die Energiebalance [141]. Der Verlust an Fettmasse kann aber nicht alleine durch einen reduzierten Appetit erklärt werden. Zum einen wurde festgestellt, dass eine erhöhte lipolytische Aktivität vorhanden ist [142], was auch mit einer erhöhten Aktivität der Hormon-sensitiven Lipase (HSL) assoziiert ist. Zum anderen wurde gezeigt, dass die Aktivität der Lipoprotein Lipase (LPL) erniedrigt ist, die normalerweise auch für die Spaltung der Lipide in die fettfreien Fettsäuren zuständig ist und somit für die Energiespeicherung im WAT. Außerdem wurde in murinen sowie humanen Studien dargelegt, dass die *de novo* Lipogenese im Fettgewebe reduziert ist [142]. Durch die erhöhte Lipolyse sowie die eingeschränkte Aktivität der LPL und der reduzierten Lipogenese kommt es bei der Kachexie zu einer Hyperlipidämie [143][144]. Obwohl das BAT im Menschen nicht so weit verbreitet ist, konnte gezeigt werden, dass mehr thermogenes Gewebe in kachektischen Krebspatienten, im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollpersonen, vorlag [145]. Erstaunlicherweise konnte aber auch in Patienten mit Prostatakrebs, die übergewichtig waren, ein protektiver Effekt gegen den Krebs gezeigt werden [146], was durchaus mit den oben genannten ALS-Fakten korreliert.

1.3.2 Inflammation

Inflammation ist der Versuch des Körpers sich selbst zu schützen, indem eine Entzündungsreaktion eingeleitet wird. Das Ziel ist es u.a. beschädigte Zellen, Toxine oder Krankheitserreger zu entfernen und anschließend den Heilungsprozess einzuleiten.

Gliazellen, wie Astrozyten und Mikroglia, sind nicht-neuronale Zellen, die die neuronale Homöostase unterstützen und schützen. Meist werden sie durch falschgefaltete oder aggregierte Proteine aktiviert [147]. Es gibt einige Hinweise darauf, dass Astrozyten und Mikrogliazellen an der Auslösung bzw. der Verschlechterung der ALS-Pathologie beteiligt sind [148][149]. In Reaktion auf Schäden, ändern Mikroglia ihre Konformation und wandern zu den geschädigten Zellen und setzen reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS), pro-inflammatorische Zytokine oder andere toxische Moleküle frei und leiten so eine Phagozytose ein, was zu einer neuronalen Dysfunktion oder sogar zum Absterben von Neuronen führen kann [150]. Allerdings produzieren Mikrogliazellen auch mitogene und neurotrophe Faktoren sowie anti-inflammatorische Zytokine, was eine neuroprotektive Funktion während der Neuroinflammation vermuten lässt [151]. Interessanterweise konnte mit einer Positronen-Emissions-Tomographie (PET) eine Mikroglia-Aktivierung im primären Motorcortex und im Rückenmark bei der ALS, abgebildet werden [152][153]. Außerdem ergaben Analysen von post-mortem Gewebe von ALS-Patienten eine erhöhte Anzahl an reaktiven Mikrogliazellen im primären Motorcortex und dem ventralen Horn des Rückenmarks [154]. Zudem wurde

gezeigt, dass die Mikroglia-Aktivierung mit der Schwere der ALS korrelierte [152]. Im G93A-SOD1-Mausmodell konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Es wurde eine Erhöhung an reaktiven Mikrogliazellen im ventralen Horn des Rückenmarks festgestellt und ein Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf der ALS hergestellt [155]. Astrozyten verändern sich, auch bei ALS, aufgrund von pathologischen Zuständen auf molekularer und morphologischer Ebene und entwickeln einen reaktiven Charakter [156]. Im Allgemeinen besitzen Astrozyten einige wichtige Funktionen, wie die Aufrechterhaltung einer niedrigen extrazellulären Glutamat-Konzentration. Defekte am EAAT2/GLT-1 Transporter, über die die Astrozyten das Glutamat aufnehmen, wurden bereits in ALS-Patienten und im SOD1-Mausmodell festgestellt [157][158]. Außerdem setzen Astrozyten unter normalen Bedingungen neurotrophe Komponenten frei, die für die neuronale Stabilität und auch für das Überleben von Motoneuronen wichtig sind. Es wird postuliert, dass es durch reaktive Astrozyten zum Absterben von Motoneuronen bei der ALS kommen kann [159] und, dass reaktive Astrozyten bei der ALS neurotoxische Faktoren wie den *nerve growth factor* (NGF) freisetzen können. Es wurde sogar schon bewiesen, dass die Freisetzung von NGF eine Apoptose in Motoneuronen induziert [160]. Im Rückenmark von ALS-Patienten befinden sich reaktive Astrozyten, ebenso wie die Mikroglia im ventralen Horn, aber auch im dorsalen Horn und vereinzelt in der grauen Substanz [161], was in ALS-Mäusen verifiziert werden konnte [162]. Im Gehirn von ALS-Patienten beschränkt sich das Vorkommen von reaktiven Astrozyten nicht nur auf den Motorcortex, sondern sie kommen auch in der grauen und weißen Substanz vor [163][164]. Im G93A-SOD1-Mausmodell konnte ebenfalls bereits gezeigt werden, dass es bei einer Astrozyten-Aktivierung gleichzeitig zum Verlust von Motoneuronen kommt und eine erhöhte Astrozyten-Anzahl mit dem ALS-Krankheitsverlauf positiv korreliert [165].

1.3.2.1 Zytokine

Zytokine sind die ersten Botenstoffe einer Inflammationsreaktion, die von Leukozyten, Mikroglia und Astrozyten freigesetzt werden [166]. Typ-I Zytokine (pro-inflammatorisch) steigern und Typ-II Zytokine (anti-inflammatorisch) vermindern die Inflammationsreaktion [167]. Allerdings kann eine pathologische Überexpression oder Beeinträchtigung der Zytokine eher schädlich als nützlich für den Heilungsprozess sein [168]. Zu der Familie der Zytokinen gehören Interleukine (z.B. IL-1, IL-2, IL-6, IL-10), Interferone (z.B. INF- γ), Tumornekrosefaktoren (TNF- α), Wachstums- und koloniestimulierende Faktoren (z.B. GM-CSF) sowie Chemokine (z.B. MCP-1). TNF- α gehört zu den bedeutendsten pro-inflammatorischen Zytokinen, der die Apoptose und die Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) einleiten kann [169]. Im lumbalen Rückenmark von G93A-SOD1-Mäusen konnte gezeigt werden, dass der

TNF- α mRNA-Level bereits in der späten präsymptomatischen ALS-Phase erhöht war [170]. Außerdem konnte beobachtet werden, dass auch ein signifikant erhöhter Proteinlevel von TNF- α und anderen Zytokinen wie IL-6 und IFN- γ im Rückenmark von G93A-SOD1-Mäusen, im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen, vorhanden war [171]. Zudem konnte festgestellt werden, dass TNF- α [172] und IL-6 [173] im Serum von ALS-Patienten vermehrt vorlag. Mehrere kachektische Tumortiermodelle zeigten ebenfalls einen Überschuss an zirkulierendem TNF- α [174], sowie eine erhöhte Expression anderer Zytokine wie IL-6 [175], was auch mit dem Gewichtsverlust in bestimmten Krebserkrankungen des Menschen korreliert [176][177]. Einige Studien zeigten, dass die Induktion von IFN- γ , genauso wie TNF- α , das Körperfett reduzierte, aber ohne Auswirkung auf den Gesamtkörperproteingehalt und ohne klare Assoziation zum humanen klinischen Syndrom der Kachexie [178]. Interessanterweise konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass die Behandlung von Tumortieren mit Inhibitoren gegen TNF- α [179], IL-6 [180] oder IFN- γ [181] den Proteinabbau und den Muskelmassenverlust verhindern konnte. IL-1 scheint ebenfalls eine gewisse Rolle bei der Kachexie zu spielen, aber ein direkter Mechanismus konnte bisher nicht nachgewiesen werden [178]. Darüber hinaus verursachten Zytokine in kachektischen C26-Tumormäusen eine Reduktion von myofibrillären Proteinen durch eine verminderte Expression von MyoD und die Aktivierung des UPS [182].

1.3.3 Proteinstoffwechsel im Skelettmuskel

Die Skelettmuskulatur ist ein heterogenes Gewebe aus mehreren zusammengesetzten Arten von Muskelfasern mit einer unverwechselbaren Struktur und kontraktile sowie metabolischen Funktionen. Man unterscheidet langsame (engl. *slow*, S oder Typ I)-Fasern und schnelle (engl. *fast*, F oder Typ II)-Fasern. In S-Muskelfasern findet eine eher langsame Kontraktion statt, wodurch sie für eine Ausdauerfunktion, wie Laufen oder Stehen zuständig sind. Zu den S-Fasern gehört unter anderen der *Musculus soleus*. Wohingegen die F-Muskelfasern für eine schnelle Umsetzung der Muskelkraft durch eine schnelle Kontraktion der Fasern benötigt werden und somit Funktionen wie Rennen, Springen, Kniebeugung und Plantarflexion übernehmen. Skelettmuskeln wie der *Musculus gastrocnemius* (GC), der *Musculus tibialis anterior* (TA) und der *Musculus extensor digitorum longus* (EDL) gehören zu den F-Fasern. Die Skelettmuskeln dienen der Bewegung, der körperlichen Stabilität und sind ein entscheidender Faktor bei der Aufrechterhaltung der Homöostase. Im Grunde herrscht im Skelettmuskel ein Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Proteinabbau. Bei der ALS kommt es allerdings zu einer Muskelatrophie. Atrophie bedeutet eine Abnahme der Zellgröße hauptsächlich verursacht durch den Verlust von Organellen, Zytoplasma oder Proteinen. Die Skelettmuskelatrophie reduziert zum einen

Behandlungsmöglichkeiten und deren positiven klinischen Ausgang, zum anderen beeinträchtigt sie aber auch die Lebensqualität der Patienten und erhöht die Morbidität und Mortalität [183][184]. Die Muskelatrophie wird definiert durch eine niedrige Muskelmasse sowie eine niedrige Muskelfunktion (Kraft oder Leistung) [185]. Eine reduzierte Querschnittsfläche von Muskelfasern, mit späterer Beeinträchtigung der Muskelfaser-Festigkeit, ist das Hauptmerkmal der Muskelatrophie [186]. Interessanterweise wurde 2002 beschrieben, dass ALS-Patienten, die einen langsameren Verlauf der ALS aufwiesen, einzelne Muskelfasern mit erhöhtem Muskelfaserquerschnitt besaßen [187]. Weiterhin wurde gezeigt, dass F-Muskelfasern im G93A-SOD1-Mausmodell der ALS, früher (~50 Tage vor dem Beginn der Symptome) als S-Fasern atrophieren [188][189]. Außerdem wird vermutet, dass die S-Muskelfasern, im Gegensatz zu den F-Muskelfasern, im G93A-SOD1-Mausmodell der ALS resistenter gegenüber der Atrophie zu sein scheinen [190]. Erstaunlicherweise konnte während des Krankheitsverlaufes im G93A-SOD1-Mausmodell eine Umwandlung von schnell atrophierenden Fasern zu langsam atrophierenden beobachtet werden, um somit resistenter gegen die Muskelatrophie zu sein [191]. Bei Kachexie wurde auch festgestellt, dass die F-Muskelfasern schneller atrophieren als die S-Muskelfasern [192]. Die Muskelatrophie ist mit katabolen Vorgängen assoziiert, die nicht nur zu einer reduzierten Muskelmasse, sondern auch zu einer verminderten Leistungsfähigkeit führt, die die Lebensqualität der Patienten sehr einschränkt [193]. Bei Kachexie wird ebenfalls das Gleichgewicht des Proteinstoffwechsels auf die Seite des Katabolismus verschoben. Es kommt zu einem erhöhten Katabolismus bei gleichzeitiger Reduzierung des Anabolismus, wobei es vorrangig zum Abbau der Skelettmuskulatur kommt [194]. Der krankheitsbedingte Muskelmassenverlust ist mit der Aktivierung von proteolytischen Systemen verknüpft, sowohl bei Versuchstieren [195] als auch beim Menschen [196]. Zu den proteolytischen Prozessen, die eine Proteindegradation nach sich ziehen, gehören das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), die Apoptose mit Caspasenaktivierung, die Autophagie, lysosomale Proteine, Calpaine und Matrix Metalloproteinasen [197].

1.3.3.1 Myostatin-Signalkaskade

Einer der wichtigsten Muskelmassen-Regulatoren ist Myostatin, auch bekannt als *growth and differentiation factor-8* (GDF8). Myostatin ist ein Mitglied der TGF- β Familie und wird vornehmlich im Skelettmuskel exprimiert sowie sekretiert und agiert als ein negativer Regulator des Muskelwachstums. Myostatin zirkuliert im Blut in einer latenten *full-length precursor* Form (inaktiv), die durch die Abspaltung einer Pro-Domäne am C-Terminus zum aktiven Myostatin wird [198]. Mutationen im Myostatin (MSTN)-Gen führen zu einem hypertrophen Phänotyp. Die Induktion einer erhöhten Muskelmasse

wurde bereits in Mäusen, Schafen sowie Rindern und beim Menschen gezeigt (Abbildung 2) [199][200][201][202].

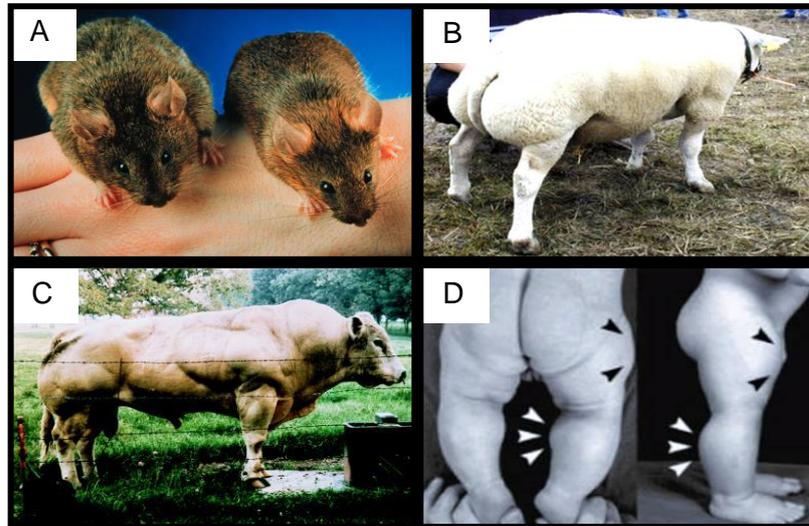


Abbildung 2: Inaktivierende Myostatin (MSTN)-Genmutationen induzieren ein erhöhtes Wachstum an Muskelmasse. (A) Myostatin Null Mauslinie $MSTN^{-/-}$ (links) im Vergleich zu einer WT Maus (rechts) [203], (B) Texel Schaf [204], (C) Weißblauer Belgier (Bulle) [201], (D) Fotos eines Kindes 6 Tage (links) und 7 Monate (rechts) nach der Geburt. Die Pfeile zeigen die vorstehenden Muskeln im Oberschenkel- und Wadenbereich [202].

Diese Eigenschaft machte man sich in einigen Tierstudien zu Eigen, indem man versuchte die Funktion von Myostatin zu inhibieren. Allerdings existieren nur ein paar Studien, in denen die Myostatin-Inhibition im Muskel erforscht wurde. Zum Beispiel wurden 24 Monate alte Mäuse mit einem neutralisierenden anti-Myostatin Antikörper für fünf Wochen behandelt, was zu einem 12%igen Anstieg der Muskelmasse führte [205]. 2015 wurde eine Mausstudie mit einem humanen anti-Myostatin Antikörper durchgeführt, die die vorangegangenen Ergebnisse unterstützte. Durch die Myostatin-Hemmung kam es zur einer Erhöhung der Muskelfasergröße, Muskelmasse und -kraft. Außerdem verhinderte der Antikörper die Abnahme der Muskelmasse und erhöhte die Zunahme der Muskelmasse während der Wiederherstellung einer bereits bestehenden Atrophie [206]. In einer anderen Mausstudie wurde die Funktion von Myostatin in vier Monate alten Mäusen durch eine Tamoxifen induzierte Cre-Rekombinase, die das geflochte MSTN-Gen entfernt hatte, gehemmt. Hierbei kam es zu einem Anstieg der Muskelmasse von 25 % in den drei darauffolgenden Monaten [207]. In einer Myostatin-Null-Mauslinie ($MSTN^{-/-}$), in der Myostatin deletiert wurde, konnte beobachtet werden, dass die Anzahl an Nervenfasern zunahm sowie die altersbedingte Neurodegeneration verzögert wurde und es gleichzeitig zu einem Anstieg der Muskelspindeln kam, was die Anwendung von Myostatin-Inhibitoren für die Therapie von neuromuskulären Erkrankungen interessant machte [208][209]. Schon 2006 konnte in einem SOD1-

Mausmodell der ALS eine signifikante Zunahme des Körpergewichtes und der Greifkraft sowie eine erhöhte Muskelgröße vorrangig während der frühen ALS-Phase durch einen neutralisierenden anti-Myostatin-Antikörper (RK35) erreicht werden. Allerdings konnte weder die Lähmung der Extremitäten verzögert, noch das Überleben verlängert oder der Motoneuronen-Verlust verlangsamt werden [210]. Darüber hinaus scheint Myostatin bei der Entwicklung von Kachexie eine entscheidende Rolle zu spielen. Eine systemische Überexpression von Myostatin in adulten Mäusen etwa, induzierte eine schwere Kachexie mit Muskel- und Fettmassen-Verlust [211]. Auch hier wurden Studien mit Myostatin-Inhibition erfolgreich durchgeführt. So konnte beispielsweise durch eine genetische Deletion von Myostatin die typische Skelettmuskelatrophie in einem Mausmodell der Herzinsuffizienz verhindert werden [212]. Des Weiteren wurde publiziert, dass durch eine *RNA antisense* Strategie eine erhöhte Muskelmasse in gesunden adulten Mäusen als auch in einem Mausmodell der Tumorkachexie erreicht werden konnte. Hierbei wurde die mRNA, die zur Synthese des Myostatin-Proteins dienen sollte, blockiert und inaktiviert, indem eine zur Myostatin-mRNA komplementäre Sequenz verwendet wurde [213].

Die transgene Überexpression eines bekannten extrazellulären Myostatin-Inhibitors, Follistatin, förderte eine starke Zunahme der Muskelmasse, sogar höher als die in der *MSTN*^{-/-}-Maus [200]. Follistatin bindet an Myostatin mit einer hohen Affinität und blockiert so die Myostatin-Signalkaskade [214]. Im SOD1-Mausmodell der ALS wurde durch eine Virus-gekoppelte-Follistatin-Injektion in den Skelettmuskel die Muskelmasse erhöht und die Muskelkraft verbessert, allerdings ohne positive Effekte auf das Überleben. Wurde Follistatin jedoch in das ZNS injiziert wurde, neben der gesteigerten Muskelkraft, auch das Leben verlängert [215]. Im AH-130 Yoshida Hepatoma Tumorkachexie-Rattenmodell konnte 2008 gezeigt werden, dass die Myostatin-Expression im GC vier Tage nach Tumorgabe erhöht und der Follistatin-Level reduziert war. Am Tag 7 nach Tumoringokulation zeigten die Tiere jedoch erhöhte Level von Myostatin und Follistatin [216].

Myostatin bindet an und aktiviert einen Activin Rezeptor IIB (ActRIIB)/Alk-4/5-Komplex [217]. Es liegt die Vermutung nahe, dass eine Blockade oder Inaktivierung des ActRIIB die Myostatin-Signalkaskade unterbrechen kann. In der Tat konnte beobachtet werden, dass eine Zunahme des Muskelwachstums erfolgt, wenn der ActRIIB inaktiviert wird [200]. Allerdings führte ein knock-down von ActRIIB in Mäusen durch komplizierte Herzfehler direkt zum Tode nach der Geburt [218]. Eine andere ALS-Mausstudie zeigte, dass die Behandlung mit einer ActRIIB.mFc-Lösung, welche Myostatin neutralisierte, eine Zunahme des Körpergewichtes und der Muskelmasse sowie der Greifkraft bewirkte, aber nicht das Überleben verlängerte [219]. Interessanterweise

konnte aber in einem Kachexie-assoziierten Colonkrebs-Mausmodell (C26) durch die Blockade des ActRIIB-Signalweg das Leben verlängert werden [220]. Eine ebenso positive Entwicklung nahm die Behandlung mit einem humanen Antikörper (BYM-338), der gegen ActRIIB gerichtet ist. 2014 konnte mit Hilfe von Mausmodellen gezeigt werden, dass die Behandlung mit BYM-338 einen Anstieg an Skelettmuskelmasse bewirkte und auch eine Muskelatrophie verhindert werden konnte [221]. Vor kurzem wurde mit BYM-338 eine klinische Phase II-Studie für die Behandlung von kachektischen Lungenkrebs- bzw. Pankreaskrebspatienten beendet [222]. Jedoch wurden die Ergebnisse bis zum heutigen Tage nicht veröffentlicht.

Durch die Bindung des Myostatins an den ActRIIB kommt es zur Autophosphorylierung und Aktivierung von TGF- β -spezifischen Smads 2 und 3, welche mit Smad 4 einen Komplex formen. Der Smad-2/3/4-Komplex transloziert in den Kern und reguliert dort die Expression von myogenen Regulationsfaktoren (z.B. MyoD) und Atrophie-assoziierten Genen [223]. Smad assoziiert mit MyoD und inhibiert deren Wirkung [224], was darauf hindeutet, dass die Myogenese gehemmt wird. Die Myostatin-Signalkaskade ist außerdem in der Lage die Proteinkinasen B (Akt)-Phosphorylierung zu inhibieren, was zu einer Beeinträchtigung des hypertrophen Akt-Signalweges führt [225][226]. Myostatin kann auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *forkhead box* (Fox)-O1 steigern, was eine verstärkte Expression von Atrogenen nach sich zieht [227]. Abbildung 3 fasst die Myostatin-Signalkaskade zusammen.

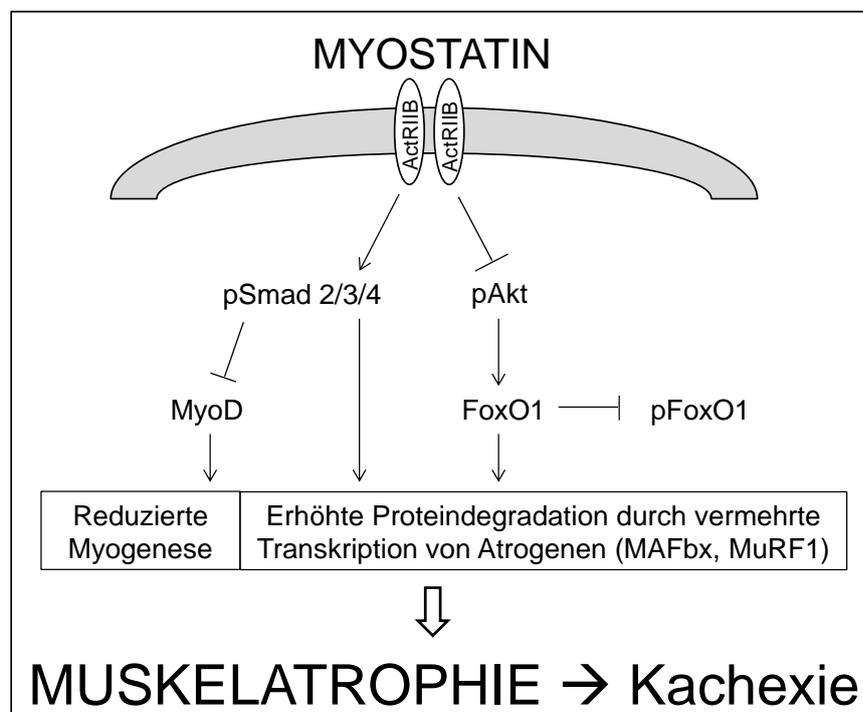


Abbildung 3: Die Myostatin-Signalkaskade löst Muskelatrophie aus und induziert Kachexie.

1.3.3.2 Akt-Signalkaskade

Neben katabolen Stoffwechselfsignalen und -proteinen ist der Anabolismus im Skelettmuskel ebenso bedeutsam. Hierbei ist der PI3K/Akt-Signalweg einer der Wichtigsten. Die Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade führt nicht nur zur Proteinsynthese, sondern hemmt auch gleichzeitig die Proteindegradation [228] (Abbildung 4).

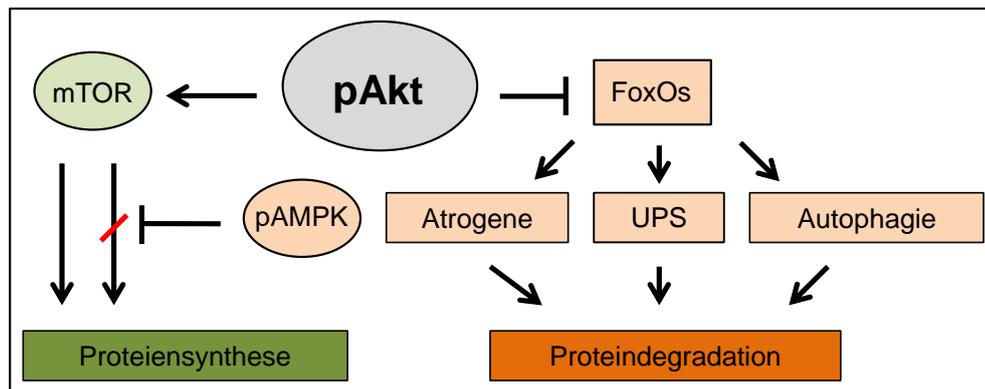


Abbildung 4: Akt als zentraler Regulator der Proteinsynthese und -degradation

Die Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges kann die Hemmung von FoxO-Transkriptionsfaktoren vermitteln, wodurch die Transkription von Atrogenen inhibiert werden kann [229]. Die FoxO-Familie besteht aus drei Isoformen, FoxO1, FoxO3 und FoxO4, wobei FoxO1 und FoxO3 bei der Muskelatrophie eine bedeutende Rolle, durch die Aktivierung vom UPS- [230][231] und Autophagie-Komponenten [232][233], besitzen. So wiesen FoxO1-transgene Mäuse deutlich weniger Skelettmuskelmasse auf [234]. Im Gegensatz dazu konnte ein FoxO1-*knockdown* die Expression von Atrogenen, während der Muskelatrophie blockieren [235]. Desweiteren ist bekannt, dass FoxO3 die Proteinneusynthese in adulten Muskeln von Säugetieren reduziert [236]. Im Zytoplasma aktiviert Akt1 die S6-Kinase (S6K1) über das *mammalian target of rapamycin* (mTOR), was eine erhöhte Proteinsynthese nach sich zieht [237]. mTOR kann aber auch durch eine *adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK) inhibiert werden [238], was die Proteinsynthese hemmt. AMPK ist ein intrazellulärer Energiesensor, der energieverbrauchende Vorgänge inaktiviert, wenn das zelluläre AMP/ATP-Verhältnis zunimmt [239]. AMPK wird durch eine Phosphorylierung am Thr-172 aktiviert [239]. Aktiviertes AMPK bewirkt die Initiation von katabolen Signalwegen, die ATP über die Fettsäureoxidation, Glukoseaufnahme oder Glykolyse erzeugen, während es gleichermaßen ATP-verbrauchende Abbauege wie die Fettsäure- und Cholesterinbiosynthese deaktiviert [239]. AMPK kann die transkriptionelle FoxO3-Aktivität stimulieren [240], wohingegen Akt FoxO3 phosphoryliert, was dazu führt, dass FoxO3 nicht mehr in der Lage ist in den Zellkern

zu gelangen und die Transkription von Atrogenen oder Autophagiegene zu starten [241]. Die Akt1-Aktivierung verursacht eine Muskelhypertrophie in transgenen Mäusen [242], wohingegen ein Akt1/Akt2-Doppel-Knockout in Mäusen eine Muskelatrophie hervorruft [243]. Muskelatrophie durch einen reduzierten Akt-Signalweg ausgelöst, wurde auch bei der ALS beobachtet. In G93A-SOD1-Mäusen konnte gezeigt werden, dass der auf das Überleben positiv wirkende PI3K/Akt-Signalweg herunter reguliert und der Transkriptionsfaktor FoxO3 stimuliert wird, was die Muskelatrophie fördert [244]. Die Hemmung der Akt-Signalkaskade konnte in Muskelbiopsien von ALS-Patienten bestätigt werden [245]. Außerdem wurde im GC im G93A-SOD1-Mausmodell, im Vergleich zu WT-Mäusen, ein signifikant erhöhter mRNA-Level von FoxO3 festgestellt [246]. In kachektischen Muskeln von *Lewis Lung Carcinoma* (LLC)-Mäusen [247] und C26-tumortragenden Mäusen [248] konnte eine signifikante Hochregulierung von FoxO1 und FoxO3 gezeigt werden. Die erhöhte FoxO1-Expression konnte ebenfalls in Skelettmuskeln von kachektischen Krebs-Patienten beobachtet werden [249].

1.3.3.3 Ubiquitin-Proteasom-System

Innerhalb der proteolytischen Systeme, die bei der Proteindegradation involviert sind, ist wohl das UPS das Wichtigste um kurzlebige Proteine abzubauen [197]. Ubiquitin kommt in allen Zelltypen vor und bis heute konnte freiem Ubiquitin keine biologische Funktion zugeordnet werden. Ubiquitin entwickelt erst Effekte, wenn es kovalent an andere Proteine bindet [250]. Bevor die Proteine jedoch abgebaut werden, müssen sie mit Ubiquitinmolekülen markiert werden. Das Substrat-Protein kann mono-ubiquitiniert oder durch Hinzufügen von weiteren Ubiquitin-Molekülen poly-ubiquitiniert werden. Mono-ubiquinierte Substrate werden wahrscheinlich in Lysosomen abgebaut [251], wohingegen die Substrate mit mehreren Ubiquitin-Molekülen durch das Proteasom degradiert werden [252]. Die Ubiquitinierung läuft in mehreren Stufen ab. Zu Beginn der Reaktion bindet Ubiquitin an ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1). E1 transferiert das aktivierte Ubiquitin an ein Ubiquitin-konjugiertes Enzym (E2), gefolgt von einer Bindung von E2 an eine Ubiquitin-Ligase (E3). Die Ligase erkennt das Substrat und überträgt Ubiquitin an das Zielprotein [253]. Anschließend werden die Zielproteine entfaltet und durch einen ATP-abhängigen Prozess im Proteasom abgebaut [254]. Als Erstes wurden 2001 zwei muskelspezifische E3 Ubiquitin-Ligasen, *muscle atrophy F-box* (MAFbx, atrogen-1) sowie *muscle RING finger 1* (MuRF1) beschrieben, die während der Muskelatrophie signifikant hochreguliert sind [255][256]. MAFbx ist Teil eines Multiprotein SCF (Skp1, Cullin1 und F-box)-Komplexes [256]. MuRF1 besitzt eine N-terminale RING-Domäne, eine Zinkfinger-Domäne (B-Box), Leucin-reiche *coiled-coil* Domänen und einen sauren C-Terminus [257]. Jedoch führte der Verlust dieser E3-Ligasen nur zu einem teilweisen Schutz gegen Muskelatrophie [255]. Über

die Relevanz von MAFbx beim myofibrillären Proteinabbau ist wenig bekannt. Bisher konnte eine Interaktion mit dem myogenen Transkriptionsfaktor MyoD [258] und dem eukaryontischen Translations-Initiationsfaktor eIF3-f [259] nachgewiesen werden, die beide eine regulatorische Funktion für die Proteinsynthese besitzen. MuRF1 bindet an ein myofibrilläres Protein Titin [260] sowie an die wohl am meisten vorkommenden Skelettmuskelproteine *myosin heavy chain* [261], *myosin light chain* und *myosin-binding protein C* [262]. 2005 wurde eine andere muskelspezifische Ubiquitin-Ligase *tripartite motif 32* (TRIM32) entdeckt [263]. Es wird vermutet, dass TRIM32, das dicke myofibrilläre Filament sowie Aktin und Dysbindin ubiquitiniert [263]. 2007 wurde dann ein neues muskelspezifisches F-Box-Protein (FBXO40) [264] gefunden, das die Ubiquitinierung vom Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) induziert, wodurch eine negative Rückkopplung auf den P3IK/Akt-Signalweg erfolgt [265]. Darüber hinaus wurde im Jahr 2010 dem *TNF- α receptor adaptor protein 6* (TRAF6) als E3-Ubiquitin-Ligase eine entscheidende Rolle bei der Atrophie zugeschrieben [266]. Einige Jahre später kamen dann zwei neue E3-Ubiquitin-Ligasen, die wie MAFbx zu der Familie des SCF-Komplexes gehören, hinzu. Zunächst wurde 2013 die *muscle ubiquitin ligase of the SCF complex in atrophy-1*-Ligase (MUSA1 oder auch Fbxo30) beschrieben [267] und 2015 dann Fbxo31 [268], die beide in Muskeln von kachektischen C26-Mäusen stark hochreguliert vorlagen [269]. Der Abbau der Ubiquitin-markierten Proteine erfolgt im ca. 2,5 MDa großen 26S-Proteasom. Die 26S-Proteasomen besitzen eine proteolytische Aktivität und kommen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vor [270]. Sie bestehen aus einem zentralen 20S-Kernkörper und aus zwei 19S-Einheiten, die an den Seiten des Kernkomplexes platziert sind [271]. Jede 19S-Einheit besteht aus einem Deckel und einer Basis, die aus Ribophorin (Rpn)- und *regulatory particle triple ATPase* (Rpt)-Proteinen aufgebaut sind. Die Rpn-Proteine erkennen, binden und entfalten die ubiquitinierten Substrate, während die Rpt-Proteine die notwendige Energie für die Entfaltung des Substrats und seine Translokation in den 20S-Kernkomplex durch ATP-Hydrolyse vermitteln [272]. Der 20S-Komplex besitzt katalytische Funktion und stellt ein proteolytisch aktives Zentrum in Form eines hohlen Zylinders mit zahlreichen α - und β -Einheiten dar [273]. Die α -Untereinheiten erfüllen hauptsächlich eine strukturgebende Funktion, wohingegen die β -Untereinheiten die eigentliche katalytische Funktion durch ihre peptidspaltende Aktivität besitzen. Die katalytische Proteaseaktivität wird von β 1-, β 2- und β 5-Einheiten übernommen, wobei alle β -Einheiten eine spezifische Spaltungsaktivität besitzen. β 1-Einheiten können Substrate an der Carboxylseite von sauren (Peptidyl-Glutamyl-Peptid-Hydrolase Aktivität, PGPH), β 2-Einheiten basische (Trypsin-ähnliche Aktivität) und β 5-Einheiten hydrophobe Aminosäuren (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität) spalten [270]. Die Substrate werden

zunächst in kurze Peptide geteilt und durch zytoplasmatische Proteasen in Aminosäuren zerlegt, wobei die übrig gebliebenen Ubiquitinmoleküle durch Deubiquitinierungsenzyme freigesetzt werden. In Abbildung 5 wird der gesamte Vorgang der Ubiquitinierung und der Protein-Degradation im Proteasom veranschaulicht.

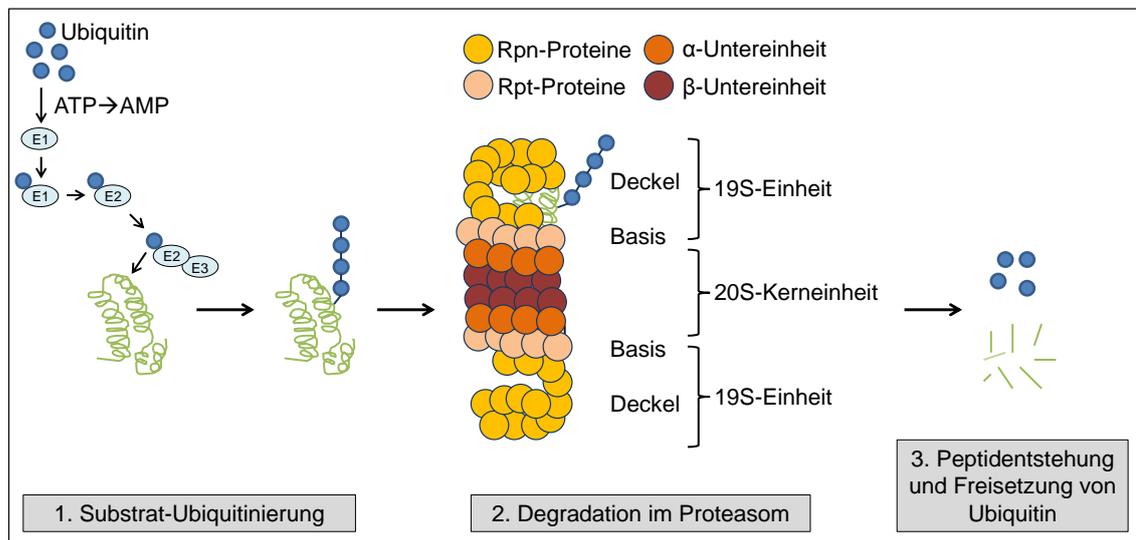


Abbildung 5: Das Ubiquitin-Proteasom-System

In Zelleinschlüssen im Rückenmark von mehreren transgenen SOD1-Mausmodellen wurden schon häufig Bestandteile des UPS gefunden [274]. Immunhistochemische Untersuchungen der ALS ergaben einen signifikanten Anstieg von Ubiquitin und Proteasom-Untereinheiten in Motoneuronen, aber auch in Astrozyten [275]. Es wurde festgestellt, dass eine Beeinträchtigung des UPS bei ALS vorhanden ist, was die Ursache und Folge der Proteinaggregate in der Zelle sein könnte [276]. Studien der Skelettmuskeln im G93A-SOD1-Mausmodell konnten zeigen, dass der mRNA-Level von MAFbx im GC verglichen mit WT-Mäusen signifikant erhöht war [277]. In einer Muskelzelllinie (C2C12) konnte eine signifikante Erhöhung der mRNA-Level von MAFbx im Vergleich zu scheintransfizierten Zellen festgestellt werden [277]. Der MuRF1 mRNA-Level war im GC-Muskel im G93A-SOD1-Mausmodell im Vergleich zu WT-Mäusen ebenfalls signifikant erhöht [246]. In kachektischen Tumor-Tiermodellen konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von Ubiquitin und Proteasom Untereinheiten sowie zusätzlich eine vermehrte Ubiquitinierung festgestellt werden [278][279]. Interessanterweise wurde auch beobachtet, dass die Levels von MAFbx und MuRF1 ebenso in Kachexie-assoziierten Krebsmodellen, wie in AH-130-Tumorratten [280] sowie im *mouse adenocarcinoma of the colon* (MAC16)-Mausmodell [281] und in kachektischen C26-Mäusen [282], erhöht waren. Andererseits wurde auch

beschrieben, dass individuelle Komponenten des UPS unverändert bzw. sogar vermindert in kachektischen Krebspatienten vorkamen [283].

1.3.3.4 Apoptose

Die Apoptose, oder auch programmierter Zelltod, wurde erstmals 1972 von Kerr *et al.* als eine häufig vorkommende Form des Zelltodes beschrieben. Charakterisiert ist sie durch eine DNA-Degradation, Chromatin-Kondensation, einer Protein-Fragmentierung sowie einer Auflösung der Kernhülle mit „Blasenbildung“ (engl. *blebbing*) der Plasmamembran und anschließender Vesikelabschnürung wie auch Schrumpfen der Zelle [284]. Die zentralen Regulatoren der Apoptose sind die Cystein-Aspartat-spezifischen Proteasen, die sogenannten Caspasen, welche evolutionär stark konserviert und sowohl im Menschen als auch in Insekten, Nematoden und sogar in Süßwasserpolyphen zu finden sind [285]. Der ursprüngliche Zusammenhang zwischen Apoptose und den Caspasen wurde erstmalig 1993 gezeigt [286]. Die Caspasen lassen sich aufgrund ihrer Struktur und Funktion in „Initiator“- (Caspase-2, -8, -9 und -10) und „Effektor“ (Caspase-3, -6, -7)-Caspasen einteilen [287]. Die Caspasen können u.a. über einen extrinsischen oder intrinsischen Weg aktiviert werden [288]. Der extrinsische Apoptose-Weg agiert sehr schnell, 1-2 h unter optimalen Bedingungen, und wird durch die Bindung von Liganden, wie FasL oder TNF sowie *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) an Todesrezeptoren induziert [289]. Diese Rezeptoren aktivieren die Pro-Caspase-8 oder -10, durch die Rekrutierung eines endogenen Adapters (engl. *Fas associated death domain*, FADD) [290]. Die Procaspase-8 bzw. -10 spalten sich und formen die aktiven Caspase-8 bzw. -10, die dann wiederum die Aktivierung der Caspasen-3 und -7 initiieren, was schlussendlich zum Zelltod führt [291]. Die Caspase-8-Aktivierung kann aber auch durch Inhibitoren, wie u.a. den zellulären *FADD-like interleukin-1- β -converting enzyme inhibitory proteins* (c-FLIPs) [288] und *apoptosis repressor with caspase recruitment domain* (ARC) [292] verhindert werden. Der intrinsische oder auch mitochondriale Weg wird durch Zellstress wie bspw. durch erhöhte intrazelluläre ROS, Hitze, Strahlung oder DNA-Schäden induziert. Er wird durch Proteine der Bcl-2 Familie reguliert und kontrolliert, welche pro-apoptische (z.B. Bax, Bak, Bid, Bad) und anti-apoptische Eigenschaften (z.B. Bcl-2) besitzen [293]. Die Zellstress-Initiatoren verursachen eine erhöhte mitochondriale Permeabilität, was zur Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma führt. Cytochrom c, zusammen mit den Adapter-Molekülen *apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1) und Pro-Caspase-9, formt das Apoptosom, welches dann als Caspase-9-Aktivierungskomplex dient [294]. Caspase-9 kann dann wiederum Caspase-3, -6, und -7 aktivieren und die Apoptose einleiten. Abbildung 6 fasst die beschriebenen Apoptose-Wege zusammen.

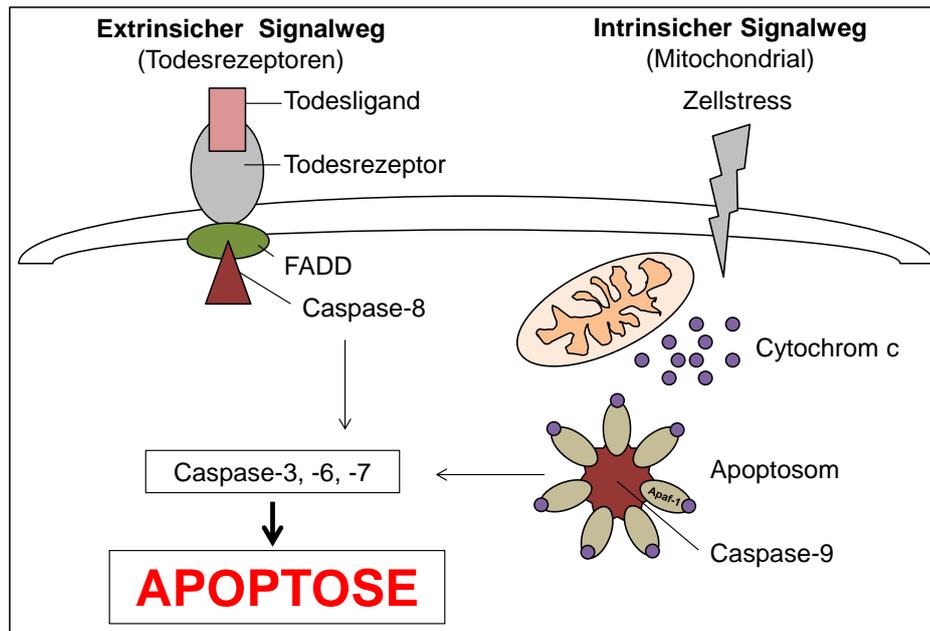


Abbildung 6: Extrinsischer und intrinsischer Signaltransduktionsweg der Apoptose

Mehrere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen der Apoptose-Aktivierung und der Entstehung von Muskelatrophie unter pathologischen Bedingungen herstellen [295]. Interessanterweise konnte im G93A-SOD1-Mausmodell der ALS eine erhöhte Expression und Aktivität der Caspase-1 und Caspase-3 festgestellt werden [244]. Bei Kachexie scheint die Induktion der Apoptose ebenso eine entscheidende Rolle zu spielen [296]. So konnte man den Verlust von Skelettmuskelmasse durch die Aktivierung mehrerer Caspasen in kachektischen Tumortieren nachweisen [297].

1.3.3.5 Autophagie

Autophagie ist ein intrazellulärer Mechanismus für die Degradation von langlebigen fehlgefalteten Proteinen bis hin zu ganzen Organellen [298]. Die Proteine und Organellen können über Mikroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie und über die Makroautophagie/„Autophagie“, welche den Großteil der intrazellulären Degradation zukommt, vom Zytoplasma zum Lysosom gelangen und degradiert werden [299]. Eine erhöhte Autophagie beeinträchtigt die Muskelfaser-Homöostase durch übermäßige Entfernung von zellulären Komponenten, die für eine normale Aktivität nötig sind. Dies kann auch zur Muskelatrophie führen, wenn eine gesteigerte katabole Aktivität über längere Zeit anhält. Eine unzureichende Autophagie hingegen hat ebenso eine Auswirkung auf die Muskelfaser-Homöostase durch die resultierende Akkumulation von nicht-degradierten oder beschädigten Zellbestandteilen. Beide Mechanismen können zu einer strukturellen und funktionellen Beeinträchtigung der Muskelfasern und letztendlich zur Muskelatrophie führen. Die Autophagie verläuft stufenweise [300], beginnend mit der Bildung einer Isolationsmembran (Phagophore),

die ein Teil des Zytosols und/oder Organellen umschließt und ein Doppelmembranvesikel, das Autophagosom, bildet. Anschließend fusioniert die äußere Membran des Autophagosoms mit einem Lysosom und bildet das sogenannte Autolysosom, was zur Freisetzung von den inneren Vesikelbestandteilen ins Lumen führt. Das eingeschlossene Material wird daraufhin von lysosomalen Enzymen abgebaut und recycelt (Abbildung 7). Bisher sind mehr als 30 Autophagie-bezogene (engl. *autophagy related*, ATG)-Gene bekannt, die die Induktion und Formation des Autophagosoms regulieren [301]. Die Induktion der Autophagy wird durch die Umwandlung von Phosphatidylinositol zu Phosphatidylinositol 3-phosphat (PI3P) durch einen Klasse III Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Komplex ausgelöst, was wiederum zu einer Rekrutierung von weiteren ATGs führt, die an der Formation des Autophagosoms beteiligt sind [302]. Ein Protein, das zum PI3K Komplex gehört, ist Beclin-1 [303]. Der präzise Mechanismus hinter der Induktion ist jedoch bis heute noch unklar.

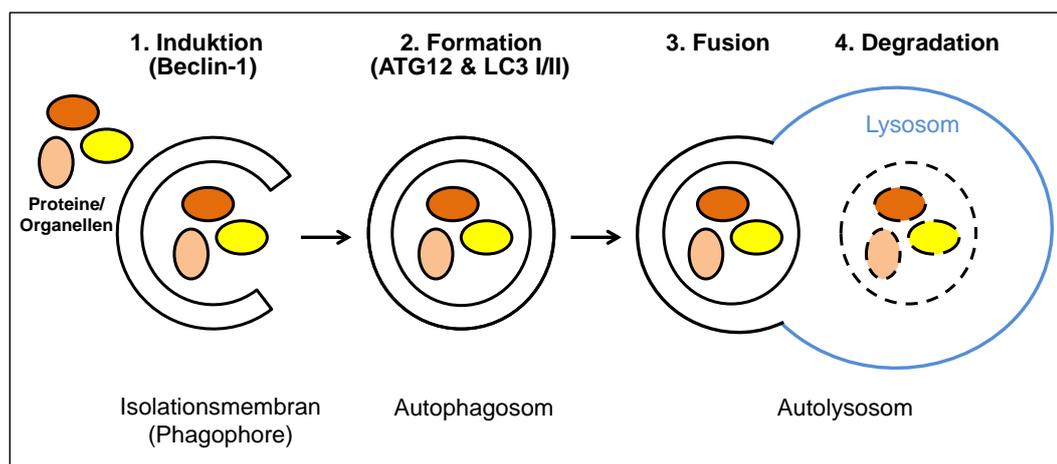


Abbildung 7: Schematischer Ablauf der Autophagie

Studien in Hefen und Säugetieren identifizierten zwei Ubiquitin-ähnliche Proteine, die bei der Autophagie eine essentielle Rolle spielen. Dabei handelt es sich zum einen um ATG12 und zum anderen um das *microtubule-associated protein 1 light chain 3* (MAP1LC3 oder LC3), die bei der Expansion der Phagophore-Membran bzw. bei der Formation des Autophagosoms agieren. Für die Formation eines Preautophagosoms ist eine ATG12-Konjugation notwendig. ATG12 wird durch ATG7 (E1-Enzym) aktiviert und auf ATG10 (E2-Enzym) übertragen, was eine Konjugation von ATG12 und ATG5 zur Folge hat. Das ATG12-ATG5-Konjugat interagiert dann mit ATG16L und formt einen multimeren Komplex, den ATG16L-Komplex, der bei der Bildung der autophagosomalen Vorstufe beteiligt ist [304]. LC3 wird durch ATG4 am C-Terminus gespalten, was eine zytosolische Form, das LC3-I, mit einem C-terminalen Glycin-Rest, erzeugt, der an Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert. LC3-I wird ebenfalls durch ATG7 aktiviert und auf ATG3, ein anderes E2-Enzym, transferiert, was zu einer

modifizierten lipidierten membrangebundenen Form, das LC3-II, führt. LC3-II ist in Preautophagosomen und Autophagosomen nachweisbar und wird deswegen auch häufig als autophagosomaler Marker eingesetzt. Nach der Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen, wird das intra-autophagosomale LC3-II durch lysosomale hydrolytische Enzyme abgebaut [305]. Mehrere Studien zeigten, dass autophagische Prozesse im Skelettmuskel nach oxidativem Stress [306] oder in Reaktion auf katabole Zustände wie Denervierung [307], induziert wurden. Tatsächlich wurde eine erhöhte Expression von Autophagie-assoziierten Faktoren, wie Beclin-1 oder LC3, in Muskeln von G93A-SOD1-Mäusen nachgewiesen [308]. Autophagie wurde ebenfalls in Muskeln von kachektischen Tumortieren wie C26-Mäusen, AH-130 Yoshida Hepatoma-Ratten und LLC-Tieren, festgestellt [309][310]. Beim Menschen konnte eine Induktion der Autophagie in Skelettmuskeln von Patienten mit Speiseröhren-, Magen-Darm- oder Bauchspeicheldrüsen-Krebs beobachtet werden [311].

1.4 Beta-Blocker

Durch Beta (β)-Blocker werden β -Adrenozeptoren (AR) selektiv blockiert und damit die Wirkung des sympathischen-adrenergen Systems durch die Hemmung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin inhibiert. Alle AR gehören zu der *guanine nucleotide-binding G protein-coupled receptor* (GPCR) Familie [312] und die Bindung von Katecholaminen oder β -Agonisten führt normalerweise zur Aktivierung der β -AR und anschließend zur Umwandlung von ATP zu cAMP durch die Adenylatzyklase und der Proteinkinase A (PKA). Die nachgeschaltete Signalkaskade reguliert dann den Energiestoffwechsel [313]. So erfolgt beispielsweise die Kontrolle des täglichen Energieverbrauchs, Thermogenese, Lipolyse oder Glukoseaufnahme über die Aktivierung des sympathischen-adrenergen Systems [314]. β -AR, zu denen die drei Subtypen β_1 , β_2 und β_3 gehören, regulieren Herzschlag, Atmung und Fettstoffwechsel. β_1 -AR beeinflussen die Frequenz, Kontraktilität und Erregungsleitung des Herzens und vermitteln in der Niere die Ausschüttung des Enzyms Renin. Durch die Aktivierung der β_2 -AR hingegen kommt es zu einer Erschlaffung der glatten Muskulatur vor allem der Bronchien, der Blutgefäße und des Uterus. Darüber hinaus sind β_2 -AR auf Immunzellen im lymphatischen Organen zu finden, wo sie die Freisetzung verschiedener Zytokine beeinflussen können [315]. β_3 -AR kommen vor allem im braunen Fettgewebe vor, weshalb sie auch eine wichtige Rolle bei der Lipolyse und Thermogenese spielen. Somit stellen β -AR wichtige Zielorte zur Behandlung von Erkrankungen wie Bluthochdruck, Asthma und Adipositas dar. Seit einigen Jahren werden β -Blocker als eine potentielle anti-kachektische Therapieform postuliert [316]. Retrospektive Studien deuten darauf hin, dass β -Blocker eine positive Wirkung auf das

Überleben bei Krebspatienten haben [317]. Interessanterweise konnte in einer weiteren Studie mit kachektischen Tumortieren gezeigt werden, dass eine β -Blocker-Behandlung neben der Überlebenssteigerung, die Körperzusammensetzung und auch einige Parameter der Lebensqualität verbesserte [318]. Es konnten ebenfalls positive metabolische Effekte nach einer β -Blocker-Behandlung unter kachektischen Zuständen festgestellt werden, einschließlich eines reduzierten REE und einer Inhibition der Lipolyse, welche zu einer Körpergewicht-, Fettmassen- und Skelettmuskelmassen-Zunahme führten [319][320]. Eine Studie ergab, dass 70 % der Gewichtszunahme, die ein β -Blocker induzieren kann, eine Erhöhung in der Fettgewebsmasse ist [321]. Im präklinischen Tiermodell konnte ebenfalls die pro-anabole und anti-katabole Wirkung eines β -Blockers (Espindolol, MT-102) sowohl auf Muskel- und Fettmasse mit einer begleitenden Verlängerung des Überlebens gezeigt werden [322]. Die anti-kachektische Wirkung von Espindolol auf die Muskel- und Fettmasse konnte in einer klinischen Studie Phase II (ACT-ONE) mit kachektischen Krebspatienten verifiziert werden [323]. Die positiven Ergebnisse von Espindolol zur Behandlung der Tumorkachexie aus der ACT-ONE Studie werden nun in einer klinischen Phase III weiter untersucht. In einigen Studien konnte bisher auch schon gezeigt werden, dass eine sympathische Überaktivierung bei der ALS vorliegt [324][325]. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass eine Behandlung mit β -Blockern einen positiven Effekt auf die kachektischen Zustände bei der ALS hat und hypothetisch die sympathische Überaktivierung mindert. Allerdings sind Hirnerkrankungen wie ALS sehr schwer zu behandeln, weil die Blut-Hirn-Schranke das Gehirn vor fremden Molekülen, welche die Homoöstase des Gehirns und des zentralen Nervensystems stören könnten, schützt. Daher wurden in dieser Arbeit lipophile β -Blocker verwendet, die die Blut-Hirn-Schranke durchdringen können. Dadurch wird eine bessere Behandlung ermöglicht, die vielleicht auch einen direkten Effekt auf die Motoneuronen-Anzahl besitzt. Es wurden zum einen Propranolol und Oxprenolol als β -Blocker-Razemate eingesetzt, zum anderen aber auch die Enantiomere von Oxprenolol (*S*- und *R*-Form), welche eine unterschiedliche Wirkungsweise aufweisen können. Es ist bekannt, dass die beiden Enantiomere eines chiralen Arzneimittels fast immer eine unterschiedliche Pharmakologie und -kinetik aufweisen [326]. In diesem Falle ist das *S*-Enantiomer von Oxprenolol 10-35 mal aktiver als das *R*-Enantiomer [327]. Im Allgemeinen sind Propranolol und Oxprenolol nicht-selektive β -Blocker mit gleicher Affinität für β_1 - und β_2 -AR, wobei Propranolol der erste synthetisierte eingesetzte β -Blocker war [328]. Des Weiteren sind Propranolol und Oxprenolol Antagonisten der Serotonin (5-Hydroxytryptamin)-Typ 1A-Rezeptoren (5-HT_{1A}) und binden an 5-HT_{1A}-Rezeptoren im Gehirn [329][330]. Propranolol besitzt keine intrinsische sympathomimetische

Aktivität (ISA), d.h. es aktiviert in keiner Weise die β -AR nach der Bindung [331]. Oxprenolol hingegen besitzt eine ISA und aktiviert zumindest partiell die β -AR während der Blockade [331].

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es zum einen die Kachexie im G93A-SOD1-Mausmodell der ALS zu charakterisieren und zum anderen präventive als auch therapeutische Stellgrößen zu untersuchen, die die Kachexie bei ALS mindern können. Im Mittelpunkt standen dabei phänotypische Parameter wie das Körpergewicht, die Körperzusammensetzung (Fettmasse und fettfreie Masse, Masse des braunen Fettgewebes) und die Ermittlung der Gewichte von Herz und ausgewählten Skelettmuskeln sowie von neurologischen Krankheitsgraden. Die pharmazeutische Behandlung mit β -Blockern sollte insbesondere den Abbau der Skelettmuskulatur verhindern und somit das bei der Kachexie und ALS auftretende katabole/anabole Ungleichgewicht ausgleichen und sich damit positiv auf das Überleben und die Lebensqualität auswirken. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Teilstudien mit folgenden Bearbeitungszielen vorgenommen:

(1) Studie zur Charakterisierung der Kachexie im G93A-SOD1-Mausmodell:

- Bei dieser Studie erfolgte eine Analyse von Körpergewicht, Fettmasse, fettfreier Masse sowie Gewicht des Herzens, des braunen Fettgewebes und einiger Skelettmuskeln zu bestimmten Zeitpunkten ohne pharmazeutische Behandlung (vor, 10-, 20-, 30-, 41-Tage nach Krankheitsbeginn und zum finalen Krankheitszustand).

(2) Überlebensstudie:

- Durch diese Teilstudie wurde der Einfluss der β -Blocker-Behandlung auf den Krankheitsverlauf und auf das Überleben der ALS-Mäuse untersucht.

(3) Vergleichsstudie:

- Diese Studie diente letztendlich dem Vergleich verschiedener Parameter zu einem einheitlichen Zeitpunkt mit und ohne β -Blocker-Behandlung. Im Fokus standen die Analyse des Körpergewichtes, der Körperzusammensetzung und der Organgewichte (Energistoffwechsel).
- Des Weiteren wurde der β -Blocker-Behandlungseffekt auf die Motoneuronendegeneration (Anzahl der Motoneuronen, Inflammation) und der Muskelatrophie (Proteinstoffwechsel) untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Tabelle 1: Reagenzien

| Reagenz | Hersteller |
|---|---|
| 2-Solution DAB Kit | Dako [®] , Hamburg, D |
| 30 % Acrylamid/ Bis Solution, 29:1 | Bio-Rad [®] , München, D |
| Albumin Bovine Fraction V Power (BSA) | SIGMA-ALDRICH [®] , München, D |
| Ammoniumpersulfat | SERVA [®] , Heidelberg, D |
| Adenosintriphosphat | SIGMA-ALDRICH [®] , München, D |
| Bromphenolblau | SERVA [®] , Heidelberg, D |
| CHAPS | SERVA [®] , Heidelberg, D |
| <i>Complete[™] Mini, Protease Inhibitor Cocktail</i> | Roche [®] , Grenzach-Wyhlen, D |
| Dinatriumhydrogenphosphat | MERCK KGaA [®] , Darmstadt, D |
| Dimethylfumarat | SIGMA-ALDRICH [®] , München, D |
| Dimethylsulfoxid | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |
| Dithiothreitol(1M) | SIGMA-ALDRICH [®] , München, D |
| EDTA (0,5M) | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |
| Entwickler-Lösung | AGFA, Mortsel, Belgien |
| Ethanol ≥99,8 %, p.a. | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |
| Ethanol 100 %, 96 % vergällt | Herbeta, Berlin, D |
| Eosin (1 %) | Waldeck GmbH & Co.KG, Münster, D |
| Fixierer-Lösung | AGFA, Mortsel, Belgien |
| 37 % Formaldehyd | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |
| <i>Gentra Puregene Mouse Tail Kit</i> | QIAGEN [®] , Venlo, Niederlande |
| Glycerol | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |
| Glycin | SERVA [®] , Heidelberg, D |
| Guanidinhydrochlorid | AppliChem [®] GmbH, Darmstadt, D |
| HEPES (1M; pH 7,5) | Thermo Scientific [®] , Massachusetts, USA |
| IGEPAL [®] CA-630 | SIGMA-ALDRICH [®] , München, D |
| Isopropanol | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |
| Kaliumchlorid | MERCK KGaA [®] , Darmstadt, D |
| Kaliumdihydrogenphosphat | MERCK KGaA [®] , Darmstadt, D |
| β-Mercaptoethanol | SIGMA-ALDRICH [®] , München, D |
| Magnesiumchloridhexahydrat | MERCK KgaA [®] , Darmstadt, D |
| Mayer´s Hämalaun | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |
| Methanol | SIGMA-ALDRICH [®] , München, D |
| Natriumchlorid | SERVA [®] , München, D |
| Natriumhydroxid (1N) | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |
| Neo-Mount [®] (wasserfreies Eindeckmedium) | MERCK KgaA [®] , Darmstadt, D |
| <i>PageRuler[™] Prestained Protein Ladder</i> | Thermo Scientific [®] , Massachusetts, USA |
| <i>PageRuler[™] Plus Prestained Protein Ladd.</i> | Thermo Scientific [®] , Massachusetts, USA |

| | |
|--|---|
| Paraffin Typ 6 und Typ 9 | Thermo Scientific [®] , Massachusetts, USA |
| Phosphatase Inhibitor (p2850) | SIGMA-ALDRICH [®] , München, D |
| <i>Pierce ECL Western Blotting Substrate</i> | Thermo Scientific [®] , Massachusetts, USA |
| 1,2 % gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung | AppliChem [®] GmbH, Darmstadt, D |
| Protease Inhibitor (p8340) | SIGMA-ALDRICH [®] , München, D |
| <i>Maxima Power SYBR Green PCR Mastermix</i> | Thermo Scientific [®] , Massachusetts, USA |
| <i>Quick Start[™] Bradford Dye Reagent, 1x</i> | Bio-Rad [®] , München, D |
| Quick Start [™] BSA (2mg/ml) | Bio-Rad [®] , München, D |
| Ricinus Communis Agglutinin I (biotinyliertes Lectin) | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| Reinstwasser | MERCK KgaA [®] , Darmstadt, D |
| Salzsäure (1N) | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |
| SDS-Pellets | SERVA [®] , Heidelberg, D |
| Sucrose | SIGMA-ALDRICH [®] , München, D |
| TEMED | SERVA [®] , Heidelberg, D |
| TRIS | SERVA [®] , Heidelberg, D |
| TRIS-HCL | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |
| Tween [®] -20 | SIGMA-ALDRICH [®] , München, D |
| Vectastain [®] -ABC Peroxidase Kit | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| Xylolersatz Neo-Clear [®] | MERCK KgaA [®] , Darmstadt, D |
| Zitronensäure | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |

2.1.2 Geräte und Materialien

Tabelle 2: Geräte und Materialien

| Gerät/Material | Hersteller |
|--|---|
| Adhesive PCR Film | peqlab Biotechnology GmbH [®] , Erlangen, D |
| Amersham Hyperfilm [™] ECL | GE Healthcare, Little Chalfont, UK |
| Deckgläser | Menzel-Gläser [®] , Braunschweig, D |
| Dispergiergerät | POLYTRON [®] , Kinematica, Inc, Bohemia, USA |
| Echo MRI-100 (Body Composition Analyzer) | Echo Medical Systems, Houston, Texas, USA |
| Einbettautomat EC 350-1/EC 350-2 | Microm International GmbH, Walldorf, D |
| Einbettkassetten für Biopsien | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |
| Entwicklermaschine Curix60 | AGFA, Mortsel, Belgien |
| <i>Extra Thick Western Blot Paper</i> | Thermo Scientific [®] , Massachusetts, USA |
| Fotokassette BAS 2325 | Fujifilm, Tokio, Japan |
| Gewebezerkleinerer | Charité Werkstatt, Berlin, D |
| iCycler IQ | Bio-Rad [®] , München, D |
| Immobilon [®] -FL PVDF Membran | MERCK KgaA [®] , Darmstadt, D |
| Laborwaage | Ohaus Corporation, Pine Brook, NY, USA |
| Luminex | Luminex [®] Corporation [™] , Austin, USA |
| Magnetrührer | IKA [®] Werke GmbH & Co.KG, Staufen, D |
| Mikroplatten Spektrophotometer xMark [™] | Bio-Rad [®] , München, D |
| Mikroskop BZ 9000 | Keyence [®] , Neu-Isenburg, D |

| | |
|---|--|
| Minishaker | IKA [®] Werke GmbH & Co.KG, Staufen, D |
| NanoDrop ND-2000 | peqlab Biotechnology GmbH [®] , Erlangen, D |
| Objektträger Superfrost Plus | VWR [®] , Darmstadt, D |
| <i>Odyssey Fluorescent Imaging Systems</i> | LI-COR [®] Biotechnology, Nebraska, USA |
| pH-Meter | HANNA instruments [®] , Kehl am Rhein, D |
| Pipettierhilfe Rota-Filler 3000 [®] | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |
| Plattformschüttler Unimax 1010 | Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, D |
| <i>Power Supply Pegpower 300</i> | peqlab Biotechnology GmbH [®] , Erlangen, D |
| Präzisionswaage CP225D | Sartorius [®] AG, Göttingen, D |
| Real-Time PCR System (Stratagene Mx 3000P) | Agilent Technologies [®] , Santa Clara, USA |
| Rotationsmikrotom HM 325 | Microm International GmbH, Walldorf, D |
| <i>Shandon Citadel Tissue Processor 1000</i> | Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA |
| <i>Single use animal feeding needle</i> | Fine Science Tools [®] , Heidelberg, D |
| Sonifizierer HD 2070 MS 72 | BANDELIN SONOPLUS [®] , Berlin, D |
| Spritzen (1 ml) | BD Plastipak [™] , B. Braun, Melsungen, D |
| <i>Standard 96 Well Plate</i> durchsichtig | SIGMA-ALDRICH [®] , München, D |
| <i>Standard 96 Well PCR Plate</i> durchsichtig | peqlab Biotechnology GmbH [®] , Erlangen, D |
| <i>Standard 96 Well PCR Plate</i> schwarz | BERTHOLD Technologies GmbH & Co.KG, Wildbad, D |
| Thermocycler | Biometra GmbH, Göttingen, D |
| Thermomixer comfort | Eppendorf [®] , Hamburg, D |
| Tierfutter (ssniff R/M-H) | ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D |
| Tischzentrifuge SD 220 VAC | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |
| <i>Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell</i> | Bio-Rad [®] , München, D |
| Trockenofen INCO2 | Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, D |
| Twinkle-Fluorometer | BERTHOLD Technologies GmbH & Co.KG, Wildbad, D |
| <i>Twin-Plate Wide Format</i> | Carl Roth [®] , Karlsruhe, D |
| Ultra-Turrax | IKA [®] erke GmbH & Co.KG, Staufen, D |
| Wasserbad Störk Tronic | Mikrotome GmbH, Wiesmoor, D |
| Zentrifuge 5804R | Eppendorf [®] , Hamburg, D |

2.1.3 Tiere

Tabelle 3: Mausstämme

| Tierstamm | Geschlecht | Alter/Gewicht bei Zucht bzw. Versuch | Hersteller |
|-----------|--------------------|--------------------------------------|---|
| SJL | Maus-Zuchtmännchen | ca. 14 Wochen, Ø 26 g | The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA |
| C57Bl/6 | Maus-Zuchtweibchen | ca. 14 Wochen, Ø 26 g | The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA |

| | | | |
|-------------------------------|--|-----------------|---|
| B6.Cg-Tg (SOD1*G93A)1Gur/J | Transgene Maus- Männchen für die Zucht | 60 Tage, Ø 22 g | The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA |
|-------------------------------|--|-----------------|---|

2.1.4 Medikamente

Tabelle 4: Medikamente

| Medikament | Hersteller |
|--------------------------------|---|
| Isofluran | Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden, D |
| Oxprenolol | Peakdale Molecular Ltd., Chapel-en-le-Frith, UK |
| Propranolol | SIGMA-ALDRICH®, München, D |
| Riluzol (Handelsname Rilutek®) | Sanofi aventis, Frankfurt, D |
| R-Oxprenolol | Peakdale Molecular Ltd., Chapel-en-le-Frith, UK |
| S-Oxprenolol | Peakdale Molecular Ltd., Chapel-en-le-Frith, UK |

2.1.5 Lösungen

Tabelle 5: Lösungen

| Lösung | Zusammensetzung |
|------------------------------------|---|
| Antikörper-Ablöse-Puffer (pH 7,5) | 6M Guanidinhydrochlorid ; 0,2 % (v/v) IGEPAL® CA-630; 0,1M β -ME; 20mM Tris/HCl |
| Blockpuffer (WB) | 5 % (w/v) BSA/TBST |
| Caspase-Lysispuffer | 100mM HEPES (pH 7,5); 10 % (w/v) Sucrose; 0,1 % (v/v) IGEPAL® CA-630; 10mM DTT; 1 Tablette Complete Mini |
| Caspase-Aktivitätsmessungspuffer | 100mM HEPES (pH 7,5); 10 % (w/v) Sucrose; 0,1 % (w/v) CHAPS; 2 % (v/v) DMSO; 10mM DTT; 50 μ M fluorogenes Caspase-Substrat; \pm 100 μ M Caspase-Inhibitor |
| Elektrophoresepuffer (WB, 10x) | 250mM Tris/HCl (pH 8,3); 2,5M Glycin; 1 % (w/v) SDS |
| PBS (1x) | 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,76mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,3) |
| Proteasom-Lysispuffer | 10mM Tris (pH 7,5); 1mM EDTA; 2mM ATP; 20 % (v/v) Glycerin; 4mM DTT |
| Proteasom-Aktivitätsmessungspuffer | 50mM Tris (pH 8,0); 0,5mM EDTA; 40 μ M fluorogenes Proteasom-Substrat; \pm 40 μ M MG-132 |
| Sammelgelpuffer (4x) | 0,5M Tris /HCl (pH 6,8) |
| SDS-Probenpuffer (6x) | 4x Trenngelpuffer, 30 % (v/v) Glycerol; 10 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) β -ME; 0,024 % (w/v) Bromphenolblau |
| TBS (10x) | 0,2M Tris (pH 7,6); 0,74M NaCl |
| TBST (1x) | 1x TBS (pH 7,6); 0,1 % (v/v) Tween®-20 |
| TBSN (1x) | 1x TBS (pH 7,6); 0,05 % (v/v) IGEPAL® CA-630 |

| | |
|--------------------------|--|
| Transfer-Puffer (WB, 4x) | 0,1M Tris; 0,74M Glycin |
| Transfer-Puffer (WB, 1x) | 100ml 4x Transferpuffer; 100ml Methanol; 300ml dH ₂ O |
| Trenngelbuffer (4x) | 1,5M Tris/HCl (pH 8,8) |
| Zamboni-Fixierlösung | 1x PBS (pH 7,3); 15 % (v/v) wässrige Pikrinsäurelösung; 2 % (v/v) Formaldehyd |
| Zitronensäure-Lösung | 10mM (pH 6,0) |

2.1.6 Fluorogene Substrate und ihre Inhibitoren

Tabelle 6: Substrate und ihre Inhibitoren

| Substrat | Inhibitor | Zielmolekül | Hersteller |
|-------------|-------------|-------------|--|
| Ac-DEVD-AMC | Ac-DEVD-CHO | Caspase-3 | Enzo [®] Life Sciences, Lörrach, D |
| Ac-VEID-AMC | Ac-VEID-CHO | Caspase-6 | Enzo [®] Life Sciences, Lörrach, D |
| Bz-VGR-AMC | MG-132 | UPS | Enzo [®] Life Sciences, Lörrach, D |
| LLVY-AMC | MG-132 | UPS | Enzo [®] Life Sciences, Lörrach, D |
| ZLLE-AMC | MG-132 | UPS | Enzo [®] Life Sciences, Lörrach, D |

2.1.7 Antikörper

Tabelle 7: Primärantikörper

| Primärantikörper | Verdünnung | Anwendung | Hersteller |
|--|------------|-----------|--|
| α-Activin Receptor Type IIB (ActRIIB) | 1:1000 | WB | Abcam [®] , Cambridge, UK |
| α-Akt | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| α-pAkt (Ser473) | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| α-pAkt (Thr308) | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| α-AMPKα (23A3) | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| α-pAMPKα (Thr172) | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| α-ATG12 | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| α-Becnin-1 | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| α-Procaspase 3 | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| α-ChAT | 1:50 | MK | Santa Cruz Biotechnologies [®] , Heidelberg, D |
| α-Follistatin | 1:400 | WB | Abcam [®] , Cambridge, UK |

| | | | |
|------------------------------------|---------|----|--|
| α -Fox01 | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| α -pFox01 (Ser319) | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| α -Fox03a (75D8) | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| α -pFox03a (Ser253) | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| α -GAPDH | 1:12000 | WB | SIGMA-ALDRICH [®] , München, D |
| α -GFAP | 1:500 | MK | Dako [®] , Hamburg, D |
| α -LC3 II/I | 1:1000 | WB | Novus [®] Biologicals, Littleton, USA |
| α -Mafbx (E-14) | 1:200 | WB | Santa Cruz Biotechnologies [®] , Heidelberg, D |
| α -MURF1 | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| α -Myostatin/GDF-8 | 1:1000 | WB | R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt, D |
| α -pSmad2/3 (Ser465/467) | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| α -Ubiquitin | 1:1000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |

WB=Western Blot; MK=Mikroskopie

Tabelle 8: Sekundärantikörper

| Sekundärantikörper | Verdünnung | Anwendung | Hersteller |
|---|-------------------|------------------|---|
| Anti-Kaninchen IgG (HRP) | 1:5000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| Anti-Maus IgG (HRP) | 1:5000 | WB | Cell Signaling Technology [®] , Boston, USA |
| Anti-Ziege IgG (HRP) | 1:5000 | WB | Abcam [®] , Cambridge, UK |
| IRDye 680 RD Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) | 1:10000 | WB | LI-COR [®] Biotechnology, Nebraska, USA |
| IRDye 800 CW Esel anti-Ziege IgG (H+L) | 1:10000 | WB | LI-COR [®] Biotechnology, Nebraska, USA |
| IRDye 800 CW Ziege anti-Maus IgG (H+L) | 1:10000 | WB | LI-COR [®] Biotechnology, Nebraska, USA |
| Ziege anti-Kaninchen IgG (biotinyliert) | 1:100 | MK | Dako [®] , Hamburg, D |

WB=Western Blot; MK=Mikroskopie

2.1.8 Computerprogramme

Tabelle 9: Computerprogramme

| Programm | Anwendung | Hersteller |
|--------------------|---|--|
| GraphPad Prism 5.0 | Statistikauswertung | Graph Pad Software |
| ImageJ | WB | <i>National Institute of Health</i> |
| Mendeley | Literaturverwaltung | Mendeley, New York, USA |
| Microwin 2000 | Fluoreszenzmessung | BERTHOLD Technologies GmbH & Co. KG, Wildbad, D |
| MxPro QPCR | RT-PCR Programm | Agilent Technologies®, Santa Clara, USA |
| NCBI | Literaturrecherche | www.ncbi.nlm.nih.gov/ |
| xPONENT | Erfassen und Analyse von Luminex®200™ Daten | Luminex® Corporation™, Austin, USA |

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperiment

In dieser Arbeit wurden verschiedene Studien zur Untersuchung der Effekte pharmakologischer Interventionen auf die Muskelatrophie im Mausmodell der ALS durchgeführt. Zum Anfang wurde eine Studie zur Charakterisierung des Krankheitsverlaufes der ALS und der Kachexie im G93A-SOD1-Mausmodell vorgenommen. Anschließend wurde das Überleben der Mäuse nach Behandlung mit verschiedenen Pharmazeutika analysiert. In einer anderen Studie wurden die Tiere bis zu einem definierten Endpunkt mit den verschiedenen Pharmazeutika behandelt und dann euthanasiert, sodass eine experimentelle Vergleichbarkeit der verschiedenen Behandlungsgruppen gewährleistet wurde.

2.2.1.1 Verwendete Mäusestämme

2.2.1.1.1 Das G93A-SOD1-Mausmodell

Für die Experimente wurde der transgene Mausstamm B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J von der Firma *The Jackson Laboratories* (JAX) aus den USA verwendet. Dieses Mausmodell wurde 1994 von Gurney *et al.* [31] auf Grundlage von Rosen *et al.* [6] entwickelt, der als Erster berichtet hatte, dass Mutationen im Cu/Zn-SOD1-Gen für ~20 % der fALS verantwortlich sind. Die G93A-SOD1-Maus trägt eine mutierte Form des humanen SOD1-Gens, das durch den endogenen humanen SOD1-Promoter angetrieben wird. Hierbei liegt ein einziger Aminosäureaustausch von Glycin zu Alanin am Codon 93 vor. Hemizygote transgene Mäuse weisen einen ähnlichen Phänotyp zu ALS Patienten auf, der sich in einer Lähmung in einem oder beiden Hinterbeinen, aufgrund des Verlustes von Motoneuronen im lumbalen Rückenmark, äußert. Der Krankheitsbeginn der G93A-SOD1-Maus zeigt sich nach 70-90 Tagen nach Geburt und die durchschnittliche Lebenserwartung liegt bei ca. 130 Tagen nach Geburt der Tiere [332]. Zu beachten ist, dass die Weibchen mit ~133 Überlebenstagen 5 Tage länger leben als die Männchen (~128 Tage) [332][333]. Um den Krankheitsbeginn und das Fortschreiten der Krankheit zu beurteilen, wurden vom Hersteller der G93A-SOD1-Maus (*PRIZE4LIFE* und „*The Jackson Laboratory*“) bestimmte internationale Arbeitsanweisungen, sogenannte *Standard Operating Procedures* (SOPs) festgelegt [334]. Diese SOPs beschreiben die verschiedenen Stufen des Krankheitsverlaufes (Tabelle 10).

Tabelle 10: Einordnung des Krankheitsverlaufes durch Ermittlung des neurologischen Zustands nach Angaben von „The Jackson Laboratory“ [334]

| Stufe | Beschreibung |
|-------|--|
| 0 | Volle Streckung der Hinterbeine weg von der lateralen Körpermitte zwei- bis dreimal in Folge für zwei Sekunden, wenn die Maus am Schwanz hochgezogen wird. |
| 1 | Die Beine zittern und/oder die Beine sind nicht weg von der lateralen Körpermitte gestreckt. |
| 2 | Die Zehen des Tieres klappen zweimal, während des Laufens über eine 30 cm lange Strecke unter oder der Fuß schleift über die Tischoberfläche. |
| 3 | Die Maus zeigt eine starre Lähmung oder minimale Bewegung des Fußes und das Bein wird nicht mehr zur Fortbewegung genutzt. |
| 4 | Die Maus kann sich nicht mehr von alleine, nach 30 Sekunden auf der Seite liegend, aufrichten. |

Für die Ermittlung der einzelnen Stufen wurde die Beweglichkeit jedes Hinterbeines einzeln beurteilt. Anfänglich wurden die Tiere am Schwanz hoch gehoben, während sie sich mit den Vorderbeinen am Käfiggitter festhielten. Bei der Stufe 0 (keine Krankheitssymptome) mussten die Hinterbeine dreimal in Folge 2-3 Sekunden, ohne zu zittern, gestreckt sein. Als Anzeichen für die frühe Phase der Krankheit wurde das nicht mehr Durchstrecken können bzw. auch Zittern der Hinterbeine angesehen (Stufe 1). Für die Ermittlung der nächsten Stufen mussten die Tiere über eine 30 cm lange Strecke laufen (Lockung mit Haus). Dabei wurden die Hinterbeine der Tiere auf beiden Seiten genau beobachtet. Wenn die Zehen zweimal unter den Fuß klappten oder ein Fuß über den Boden geschliffen wurde, war bereits die Stufe 2 erreicht. Dem Tier wurde zu diesem Zeitpunkt Feuchtfutter (Normalfutter mit Wasser und Gelatine gemischt) in den Käfig gelegt, um ausreichende Futter- und Wasseraufnahme zu gewährleisten. Stufe 3 war vorhanden, wenn eine Lähmung des Beines eingetreten war. Das Hinterbein wurde dann nicht mehr zur Fortbewegung benutzt. Ab diesem Zeitpunkt wurde ein Test durchgeführt, ob die Tiere noch fähig sind, sich zum Futter und Wasser zu bewegen. Dafür wurden die Tiere auf die Seite gelegt und wenn das Tier innerhalb von 30 Sekunden nicht mehr fähig war von alleine aufzustehen, wurde das Experiment abgebrochen und das Tier euthanasiert (Stufe 4=Abbruchkriterium). Zur Verdeutlichung der verschiedenen Stufen wurden Fotos angefertigt (Abbildung 8).

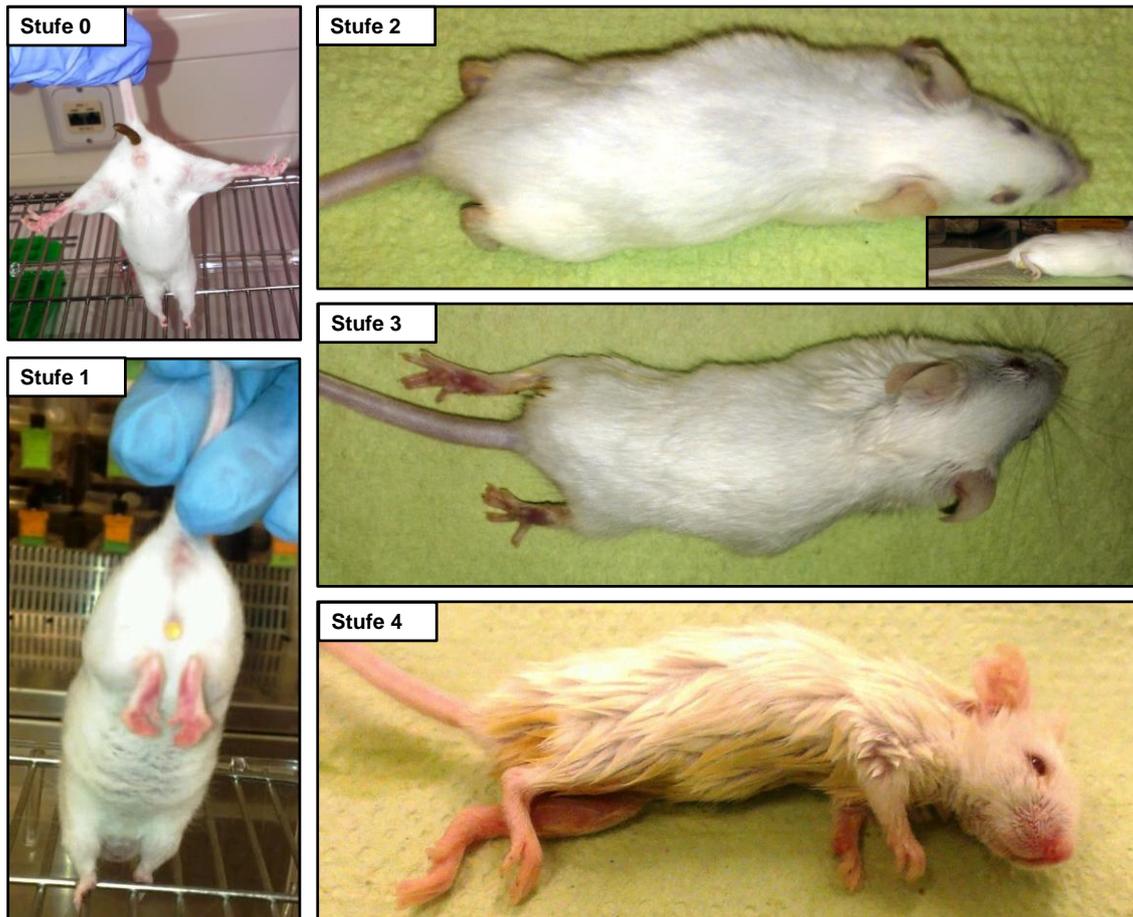


Abbildung 8: Bildliche Darstellung der neurologischen Bewertung des Krankheitszustandes

2.2.1.1.2 Weitere verwendete Mausstämme

Für die Erhaltungszucht wurden die Mausstämme SJL (Männchen) und C57Bl/6 (Weibchen) von der Firma *The Jackson Laboratories* eingesetzt.

2.2.1.2 Zucht

Für die Erhaltung der G93A-SOD1-Tiere wurden WT-Weibchen mit C57Bl/6 Hintergrund mit männlichen SJL-Mäusen gezüchtet. Anschließend wurden transgene SOD1-Männchen mit den vorher gezüchteten WT-Weibchen (C57Bl/6 Hintergrund) verpaart (Abbildung 9). Dafür wurden jeweils zwei Weibchen mit einem Männchen in einem Zuchtkäfig gehalten. Die B6SJL-Tg(SOD1*G93A)-Nachkommen wurden nach Schwanz- bzw. Ohrbiopsie mittels qPCR genotypisiert (siehe Abschnitt 2.2.2.1.3), wobei die Tiere mit hoher Anzahl an SOD1-Kopien für die Studien verwendet wurden.

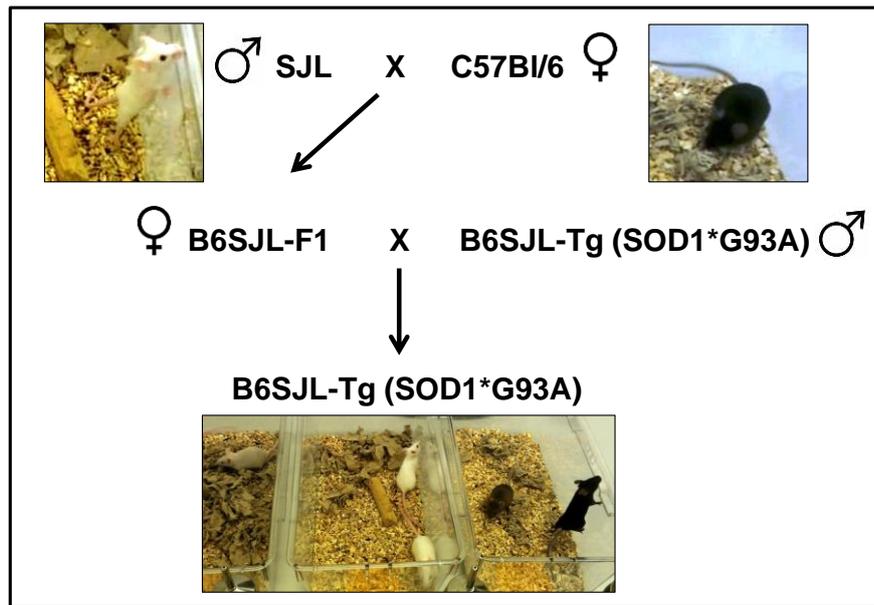


Abbildung 9: Zuchtschema für die Erhaltung der G93A-SOD1-Mäuse

2.2.1.3 Haltungsbedingungen

Alle Tierexperimente fanden im spezifisch pathogenfreien (SPF)-Bereich der Tierhaltung im *Center for Cardiovascular Research* (CCR) der Charité Universitätsmedizin Berlin statt. Die Tierexperimente wurden mit Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) unter den Anzeigennummern A 0264/10 und A 0338/11 und stets gemäß den Tierschutzrichtlinien durchgeführt. Die Mäuse wurden in Makrolon-Standardkäfigen des Typs II gehalten, wobei die Käfige individuell ventiliert wurden und somit eine eigene Hygieneeinheit bildeten. Als Anreicherung der sozialen Umgebung wurden die Tiere in geschlechtsspezifischen Gruppen gehalten und bekamen ein Häuschen oder eine Kunststoffröhre als Rückzugsort sowie Nestbaumaterial. Die Tiere unterlagen einen 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus und die Raumtemperatur (RT) lag konstant um 22°C während die Luftfeuchtigkeit 40 % betrug. Futter und Wasser konnten die Tiere *ad libitum* zu sich nehmen. Zeigten die Tiere erste Anzeichen einer Lähmung an einem Hinterbein, wurden einige Futterpellets in den Käfig gelegt. Wenn beide Hinterbeine gelähmt waren, wurde zusätzlich Feuchtfutter mit Gelatine in den Käfig gegeben. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde anhand der Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde - *Society for Laboratory Animal Science* (GV-SOLAS) und der *The Jackson Laboratory*-Richtlinien zweimal am Tag kontrolliert. Das Tier wurde euthanasiert, wenn es das Experiment erforderte oder ein erhebliches Leiden zu erkennen war. In der Überlebensstudie wurde ab neurologischer Stufe 3 ein Test durchgeführt, um den Abbruch zu definieren. Bei diesem Test wurden die Tiere auf die Seite gelegt und mussten innerhalb von 30 Sekunden wieder von alleine aufstehen. Taten sie das nicht, wurde das Experiment abgebrochen und die Tiere euthanasiert.

Wiesen die Tiere außerhalb der Versuchsreihe Apathie auf, wurden sie ebenfalls euthanasiert.

2.2.1.4 Studiendesign

Für die phänotypische Charakterisierung des Krankheitsverlaufes der ALS, insbesondere der Kachexie, wurden Tiere ohne Behandlung zu bestimmten Zeitpunkten euthanasiert (Verlaufsstudie). Es wurden Tiere vor dem Krankheitsbeginn (n=9), 10 Tage (n=10), 20 Tage (n=10), 30 Tage (n=11) und 41 Tage (n=20) nach Krankheitsbeginn sowie bis zum Erreichen des Abbruchkriteriums (n=20) bezüglich ihres Körpergewichtes, Fettmasse und fettfreien Masse untersucht. Des Weiteren wurde das Gewicht des Herzens, des braunen Fettgewebes und einiger Skelettmuskeln bestimmt und verglichen.

In einer anderen Studie (Abbildung 10) wurde das Überleben der SOD1-Tiere mit Behandlung verschiedener Pharmazeutika bestimmt (Überlebensstudie). Ab einem Alter von 60 Tagen wurden die Tiere wöchentlich gewogen und deren Körperzusammensetzung per NMR gemessen. Außerdem wurde das Fortschreiten der Krankheit mittels neurologischen Tests bestimmt. Zeigten die Tiere erste Anzeichen der Krankheit durch Lähmungserscheinungen (Stufe 1) oder Gewichtsverlust (Verlust von 0,1 g) wurde die Behandlung mit den Pharmazeutika per Gavage begonnen. Das Auftreten der ersten Symptome wird in dieser Arbeit als Erstsymptomatik definiert. Ab Erstsymptomatik wurden die Tiere jeden zweiten Tag gewogen, der neurologische Zustand bestimmt und der Anteil an Körperfett sowie der fettfreien Masse mittels NMR ermittelt. Hatten die Tiere das Abbruchkriterium erreicht (Stufe 4), wurden sie euthanasiert. Anschließend erfolgte die Blut- und Gewebe-/Organentnahme. Der Zeitraum von Erstsymptomatik/Erstbehandlung bis zum Erreichen des Endpunktes (Stufe 4) wurde als Überleben definiert. Außerdem wurde das Überleben von Geburt ebenfalls ermittelt. Die Überlebensanalyse der Tiere wurde mit einer Kaplan-Meier-Kurve durchgeführt.

In einer parallelen Studie wurden Tiere bis zu einem definierten Zeitpunkt behandelt und anschließend euthanasiert (Vergleichsstudie). Dadurch sollte für spätere Analysen eine Vergleichbarkeit erzeugt werden. Für dieses Experiment wurden nur die Behandlungsgruppen verwendet, die einen positiven Effekt auf das Überleben der G93A-SOD1-Mäuse zeigten. Der definierte Endpunkt ergab sich aus der medianen Überlebenszeit der kombinierten Placebo-Gruppen aus der Überlebensstudie. Die Mäuse wurden 41 Tage nach Erstsymptomatik euthanasiert. Das entspricht ungefähr einem Alter von 120 Tagen (Abbildung 10 grüner Stern). Zur zusätzlichen Kontrolle wurden WT-Mäuse (Alter: 120 Tage) mit gleichem genetischen Hintergrund (B6SJL), wie die G93A-SOD1-Mäuse, mitgeführt. Nach der Euthanasie wurde den Tieren Blut

abgenommen und verschiedene Gewebe/Organe entnommen. Es handelte sich um randomisierte kontrollierte Studien, bei denen die Behandlung verblindet durchgeführt wurde.

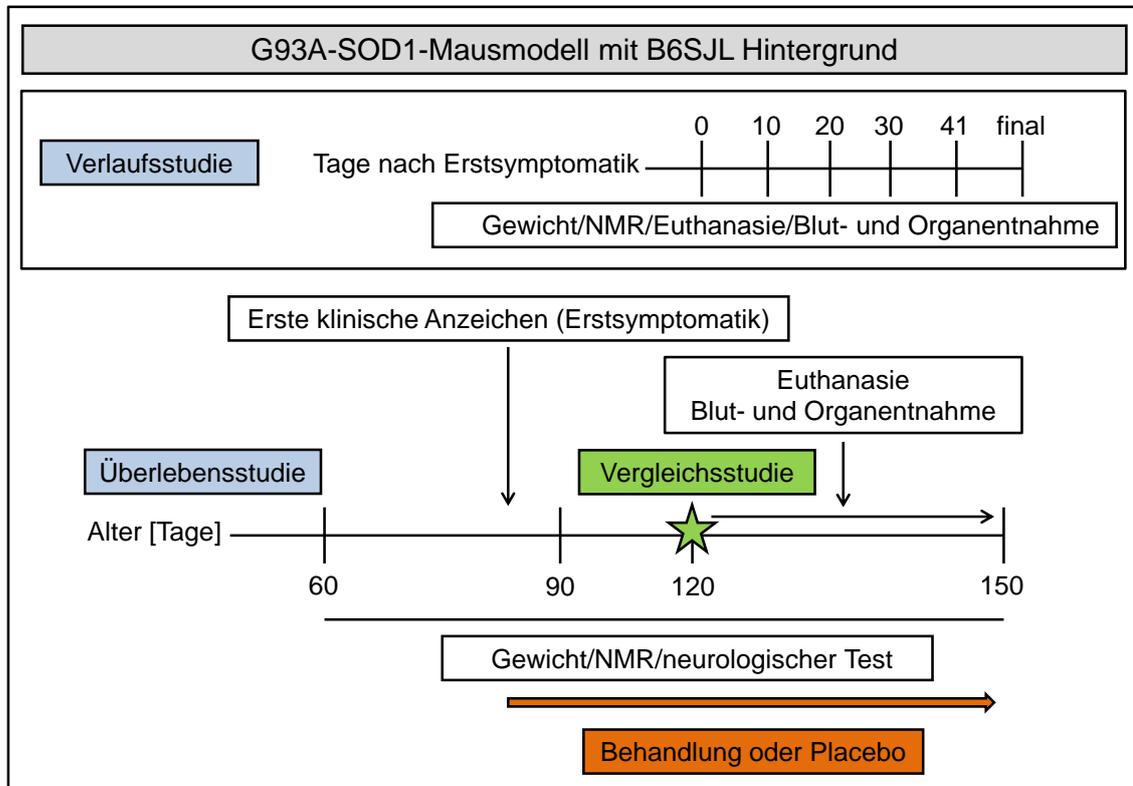


Abbildung 10: Studiendesign. In der Verlaufsstudie wurden die Tiere ohne Behandlung zu bestimmten Zeitpunkten charakterisiert. In der Überlebensstudie wurden das Gewicht und die Körperzusammensetzung wöchentlich vom 60. Lebensstag an und ab Krankheitsbeginn jeden zweiten Tag ermittelt. Der Krankheitszustand wurde per neurologischen Test wöchentlich im Alter von 60 Tagen und ab Krankheitsbeginn jeden Tag gemessen. Die Behandlung der Tiere erfolgte nach Zeigen der ersten klinischen Anzeichen (Erstsymptomatik) der ALS. Grüner Stern: Euthanasie-Zeitpunkt für die Vergleichsstudie.

2.2.1.5 Medikamente und Gruppeneinteilung

Für die Untersuchung des medikamentösen Einflusses auf die Muskelatrophie und Kachexie im G93A-SOD1-Mausmodell wurden verschiedene β -Blocker genutzt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Verwendete Pharmazeutika, deren Wirkung und eingesetzte Dosen

| Behandlung | Wirkung | Dosis [mg/kg/d] | Hersteller |
|---|--|--------------------|---|
| Oxprenolol (Razemat aus R- und S-Oxprenolol) | nichtselektiver β -Blocker mit ISA | 10 | Peakdale Molecular Ltd., Chapel-en-le-Frith, UK |
| Propranolol | nichtselektiver β -Blocker ohne ISA | 10 | SIGMA-ALDRICH®, München, D |

| | | | |
|--|--|----------|--|
| Riluzol (Handelsname Rilutek®) | Natriumkanal-Blocker (Abschwächung der Wirkung des Neurotransmitters Glutamat) | 30 | Sanofi aventis, Frankfurt, D |
| <i>R</i> -Oxprenolol (Enantiomer von Oxprenolol) | nichtselektiver β -Blocker mit ISA | 10 20 | Peakdale Molecular Ltd., Chapel-en-le- Frith, UK |
| <i>S</i> -Oxprenolol (Enantiomer von Oxprenolol) | nichtselektiver β -Blocker mit ISA | 10 20 | Peakdale Molecular Ltd., Chapel-en-le- Frith, UK |

Wiesen die Tiere erste Anzeichen der Krankheit auf, wurden Ihnen täglich die Medikamente per Gavage verabreicht. Als Kontrollgruppen dienten mit Leitungswasser-behandelte Tiere (Placebos) sowie eine Gruppe, die das bisher einzig zugelassene Medikament für die ALS erhielt (Rilutek®). Die Einteilung und Anzahl der Tiere in die verschiedenen Gruppen und die Verteilung dieser in den Projekten wird in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Gruppeneinteilung der Tiere in den Studien

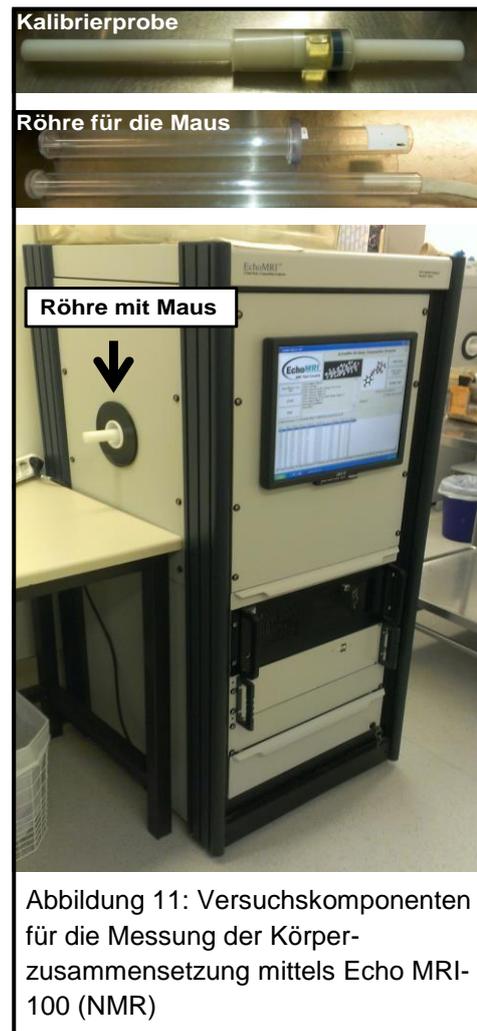
| Behandlung | Dosis [mg/kg/d] | Überlebensstudie [Anzahl der Tiere] | | | Vergleichsstudie [Anzahl der Tiere] | | |
|----------------------|--------------------|--|----------|----------|--|----------|----------|
| | | gesamt | Männchen | Weibchen | gesamt | Männchen | Weibchen |
| Oxprenolol | 10 | 28 | 13 | 15 | - | - | - |
| Placebo | - | 45 | 20 | 25 | 21 | 14 | 8 |
| Propranolol | 10 | 28 | 14 | 14 | - | - | - |
| Rilutek® | 30 | 28 | 13 | 15 | 24 | 13 | 11 |
| <i>R</i> -Oxprenolol | 10 | 29 | 14 | 15 | - | - | - |
| | 20 | 30 | 15 | 15 | 29 | 14 | 15 |
| <i>S</i> -Oxprenolol | 10 | 45 | 20 | 25 | 16 | 7 | 9 |
| | 20 | 28 | 14 | 14 | 26 | 12 | 14 |

2.2.1.6 Gewichtsermittlung

Die Gewichtsanalyse der Versuchstiere wurde immer zum gleichen Zeitpunkt des Tages durchgeführt. Dazu wurden die Tiere in einen Behälter auf eine Präzisionswaage gesetzt und das Gewicht dokumentiert.

2.2.1.7 Ermittlung der Körperzusammensetzung

Die Körperzusammensetzung wurde mit Hilfe des Gerätes Echo MRI-100 gemessen. Über dieses *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)-Verfahren (Kernspinresonanzspektroskopie) wurde das Körperfett, die fettfreie Masse und der Wassergehalt der Tiere bestimmt. Der große Vorteil dieses Systems war, dass die Körperzusammensetzung der Tiere ohne deren Betäubung gemessen werden konnte. Außerdem bietet dieses System kurze Zykluszeiten, sodass die Tiere nur einem sehr geringen Stress ausgesetzt waren. Zuerst erfolgte die Kalibrierung des Systems mit einer Öl-Probe. Anschließend wurden die Tiere so in einer Röhre platziert, dass sie sich nicht mehr bewegen konnten. Die Röhre, samt Maus, wurde dann in das Echo MRI-100 eingeführt, wobei die anschließende Messung 2 min dauerte (Versuchskomponenten für die Messung der Körperzusammensetzung mittels NMR siehe Abbildung 11).



2.2.1.8 Tötung und Organentnahme

Es wurden für die Projekte (Verlauf, Überleben, Vergleich) Tiere ohne Krankheitssymptome, mit Krankheitsbeginn +10 Tage, +20 Tage, +30 Tage, +41 Tage und in der finalen Phase euthanasiert. Nach der Tötung wurde den Tieren zunächst einige Milliliter Blut aus dem Herzen entnommen und mit EDTA versetzt. Das Blut wurde bei 3000xg für 10 min und bei 4°C zentrifugiert und die obere wässrige Phase, das Plasma, bei -80°C gelagert. Nach der Blutabnahme wurden folgende Gewebe bzw. Organe entnommen: Gehirn, Wirbelsäule mit Rückenmark, Herz, BAT sowie beidseitig die Skelettmuskeln an den Hinterbeinen (GC, TA, EDL und Soleus). Die entnommenen Organe wurden gewogen und bei -80°C gelagert bzw. für die Histologie vorbereitet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Für die Genotypisierung der G93A-SOD1-Tiere wurde zunächst DNA aus einem kleinen Mausschwanz- bzw. Ohrenstück isoliert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration bestimmt und eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, qPCR) durchgeführt.

2.2.2.1.1 DNA-Isolation von Mausschwanz- bzw. Ohrbiopsien

Um die DNA-Isolation für die Genotypisierung der Tiere durchzuführen, wurde Ihnen 19-21 Tage nach ihrer Geburt ein ca. 3 mm langes Stück der Schwanzspitze oder ein Stück vom Ohr, das durch die Ohrmarkierung der Tiere entstand, entfernt. Die DNA wurde nach Anleitung eines DNA-Isolations-Kits (Gentra Puregene Mouse Tail Kit, Quiagen) isoliert und anschließend quantifiziert.

2.2.2.1.2 Quantifizierung von DNA

Die Quantifizierung der isolierten DNA wurde mittels NanoDrop™-Spektrophotometer vorgenommen. Hierbei wurde 1 µl der DNA verwendet, wobei die Konzentration der DNA durch eine Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt wurde. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm zeigt die Reinheit der DNA an. Es wurde darauf geachtet, dass das Verhältnis immer bei ~1,8 lag, weil dieser Wert im Allgemeinen eine „reine“ DNA angibt, d.h. nahezu ohne Verunreinigungen durch RNA vorliegt.

2.2.2.1.3 qPCR

Die qPCR beruht auf dem Prinzip einer normalen Polymerase-Kettenreaktion mit dem Unterschied, dass eine Quantifizierung vorgenommen werden kann. Für die qPCR wurde ein *Maxima Power SYBR Green PCR Mastermix* (Thermo Scientific) verwendet. Dieser Mastermix enthält bereits eine Hot Start Taq DNA-Polymerase, dNTPs, einen optimierten PCR-Puffer und *SYBR Green I*, welches ein Fluoreszenzfarbstoff ist. Demnach musste nur noch das DNA Template und die Primer (Tabelle 13) zum PCR-Ansatz (25 µl) hinzugefügt werden (Tabelle 14). Außerdem wurde als transgene Positivkontrolle eine bekannte *high copy control* und als transgene Negativkontrolle eine bekannte *low copy control* verwendet. Die Intensität des fluoreszierenden Signals ist zu der Anzahl der gebildeten doppelsträngigen DNA proportional. Für die Quantifizierung wurde mittels der *MxPro QPCR Software* von jeder Probe der *cycle threshold* (C_t-Wert) der Fluoreszenzkurve ermittelt. Der C_t-Wert zeigt den Zeitpunkt an, wo das Fluoreszenzsignal gerade exponentiell über den Hintergrundwert steigt. Aus der Subtraktion der C_t-Werte der internen Kontrolle und der des Transgenes bzw. der

high oder *low copy control* ergibt sich der sogenannte delta C_T-Wert. Die delta C_T-Werte, der zu prüfenden DNA-Proben, wurden mit den *high bzw. low copy control*-Werten verglichen. Lagen die Werte im Bereich oder unter der *low copy control*-Grenze stand fest, dass das Tier wenige Kopien des G93A-SOD1-Transgens trägt. Im Umkehrschluss hatte ein Tier hohe Kopien vom Transgen, wenn der Wert im Bereich des *high copy control*-Wertes lag.

Tabelle 13: Primersequenzen für die Genotypisierung

| Primer | Forward Sequenz 5'→3' | Reverse Sequenz 5'→3' |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|
| Interne Positivkontrolle | CACGTGGGCTCCAGCATT | TCACCAGTCATTTCTGCCTTTG |
| Transgen G93A-SOD1 | GGGAAGCTGTTGTCCCAAG | CAAGGGGAGGTAAAAGAGAGC |

Tabelle 14: Protokoll für den Ansatz einer qPCR für die Genotypisierung

| Reagenz | Endkonzentration im Ansatz | Volumen [µl] |
|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| 2x Maxima SYBR Green qPCR Mastermix | 1x | 12,5 |
| Primer forward | 0,25 µM | 0,625 |
| Primer reverse | 0,25 µM | 0,625 |
| DNA | 10 ng | 2 |
| Nukleasefreies Wasser | - | ad 25 µl |

Jeder Ansatz wurde mit einem speziellen Programm (Tabelle 15) und in Triplikaten amplifiziert.

Tabelle 15: Programm für die G93A-SOD1-qPCR

| Schritt | Temperatur | Zeit | Bemerkung |
|-------------------------------|------------|--------|---|
| Initiale Denaturierung | 95 °C | 10 min | dsDNA→ssDNA |
| Denaturierung | 95 °C | 15 s | } 40 Zyklen |
| Annealing | 57 °C | 30 s | |
| Elongation | 72 °C | 30 s | |
| Erstellung einer Schmelzkurve | 95 °C | 10 s | Qualitative Untersuchung des PCR-Produktes |

2.2.3 Proteinbiochemie

2.2.3.1 Proteinextraktion aus Gewebe

Für die Untersuchung der Proteasom- und Caspase-Aktivität sowie für die Analyse der Proteinexpression wurden die zu untersuchenden Gewebe zunächst im gefrorenen Zustand pulverisiert und anschließend mit Lysis-Puffern mittels einem Dispergiergerät homogenisiert. Die Proteine wurden stets bei 4°C extrahiert.

2.2.3.2 Extraktion für Proteasom-Aktivitäts-Analyse

Für die Extraktion wurden 50 mg Gewebepulver mit 200 µl gekühltem Proteasom-Lysispuffer versehen und für 2 min auf Eis mit einem Dispergiergerät homogenisiert. Anschließend wurde die Dispersion für 20 s sonifiziert. Danach wurden die Lysate bei 13000xg für 15 min und 4°C zentrifugiert mit anschließender Wiederholung der Ultraschallbehandlung des Überstandes und darauffolgender Zentrifugation. Für die Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde ein Teil des Überstandes bei -20°C aufbewahrt. Der restliche Überstand wurde bis zur Messung der Proteasom-Aktivität bei -80°C gelagert.

2.2.3.3 Extraktion für Caspase-Aktivitäts-Analyse

50 mg Gewebepulver wurde mit 150 µl Caspase-Lysispuffer gemischt und dispergiert. Die Homogenate wurden anschließend dreimal abwechselnd in Flüssigstickstoff getaucht und dann bei 36°C im Thermomixer kurz aufgetaut. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 20000xg für 30 min und 4°C. Der Überstand wurde anschließend erneut bei 20000xg für 20 min und 4°C zentrifugiert. Ein Teil des erneut abgenommenen Überstandes wurde bis zur Bestimmung des Proteingehaltes bei -20°C eingefroren. Der Rest des Überstandes wurde bis zur Bestimmung der Caspase-Aktivität bei -80°C aufbewahrt.

2.2.3.4 Quantifizierung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate erfolgte mit dem 1x *Quick Start™ Bradford Dye Reagent*, welches an die Proteine bindet. Dafür wurden 5 µl einer 1:20 verdünnter Proteinprobe mit 250 µl Bradford-Reagenz gemischt. Die Probenplatte wurde für mindestens 5 min im Dunkeln bei RT inkubiert und anschließend wurde die OD bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt. Die OD nimmt proportional zur Proteinmenge im Zelllysate zu. Ein Kontrollwert mit jeweiligem Lysepuffer ohne Proteinprobe wurde mitgeführt und für die Zuordnung der Proteinkonzentration wurden BSA-Standards verwendet.

2.2.3.5 Ubiquitin-Proteasom-Aktivitäts-Analyse

Um die proteolytische Aktivität des UPS zu bestimmen, wurden fluorogene Substrate verwendet, die die Chymotrypsin-ähnliche, Trypsin-ähnliche und Peptidyl-Glutamyl-hydrolysierende Aktivität der Proteasom-Untereinheiten zeigen (Zuordnung der Substrate siehe Tabelle 16). Für die Messung wurden 100 µg Protein mit 40 µM fluorogenem Substrat (7-amino-4-methylcoumarin, AMC) gekoppelt und einem Tris/EDTA-Reaktionspuffer mit und ohne eines Proteasominhibitors (MG132, 40 µM) gemischt. Die Fluoreszenz der Ansätze, die durch die Spaltung des Substrates vom Proteasom entsteht und wodurch das fluorogene AMC freigesetzt wird, wurde

anschließend in schwarzen Reaktionsplatten für 30 min bei 37°C und 360ex/460em nm in einem Fluorometer ermittelt. Von den Messwerten ohne Inhibitor wurden die Messwerte mit Inhibitor subtrahiert, um die tatsächliche Menge der Fluoreszenz zu erhalten. Die entstandene Fluoreszenz wurde mittels eines AMC-Standards verglichen, wobei die Fluoreszenz die Proteasomaktivität widerspiegelt, die in nmol/mg Protein/min angegeben wird.

Tabelle 16: Substrate zur Ermittlung der proteolytischen Aktivität im Ubiquitin-Proteasom-System

| fluorogenes Substrat | Aktivität | Spaltungsziele |
|----------------------|--|------------------------|
| LLVY-AMC | Chymotrypsin-ähnliche Aktivität | hydrophobe Aminosäuren |
| Bz-VGR-AMC | Trypsin-ähnliche Aktivität | basische Aminosäuren |
| ZLLE-AMC | Peptidyl-Glutamyl-Peptid-Hydrolase Aktivität | saure Aminosäuren |

2.2.3.6 Caspase-Aktivitäts-Analyse

Für die Untersuchung der Apoptose wurden zwei fluorogene Substrate (AMC gekoppelt) repräsentativ für die Caspase-3- und Caspase-6-Aktivität genutzt. Um die Caspase-Aktivität zu ermitteln wurden 100 µg Protein mit dem Caspase-Reaktionspuffer (inklusive 2 % DMSO und 10 mM DTT) sowie mit 50 µM fluorogenen Substrat mit und ohne Substrat-Inhibitor (100 µM) gemischt und die Fluoreszenz für 1 h bei 37°C in einem Fluorometer bei einem Wellenlängenverhältnis von 360ex/460em nm bestimmt. Mittels Vergleich der Fluoreszenz von parallel bestimmten AMC Standards wurde die Caspase-Aktivität in nmol/mg Protein/min angegeben werden.

2.2.3.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. SDS-PAGE)

Mithilfe der SDS-PAGE können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Aufgrund der begrenzten Anzahl an Gewebeproben wurden für die SDS-PAGE, mit anschließendem Immunnachweis, die Proteinlysate von der Extraktion für die UPS- und Caspase-Analysen genutzt. Additiv wurden Phosphatase- und Protease-Inhibitoren hinzugefügt. Außerdem wurden die Proben mit 6x Laemmli-Puffer versehen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Für die SDS-PAGE wurden 8-15%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet, wobei ca. 10 µg Protein für die Untersuchung eingesetzt wurde (Gelzusammensetzung siehe Tabelle 17). Die Elektrophorese wurde zunächst für 30 min bei 40 V, danach bei 90 V, mit Verwendung eines Proteinstandards, in einem Tris/Glycin-Laufpuffer bei 4°C durchgeführt.

Tabelle 17: Zusammensetzung Trenngel/Sammelgel, 20 ml für 2 Gele (20 x 10 cm)

| Bestandteil | Trenngel [Endkonzentration] | Sammelgel [Endkonzentration] |
|--------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Bidest. | add. | add. |
| 30 % Polyacrylamid | 8-15 % | 5 % |
| 1,5 M Tris pH 8,8 | 0,375 M | - |
| 0,5 M Tris pH 6,8 | - | 0,125 M |
| 10 % SDS | 0,1 % | 0,1 % |
| 10 % APS | 0,05 % | 0,05 % |
| TEMED | 0,15 % | 0,15 % |

2.2.3.8 Western Blot

In dieser Arbeit wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran mit der Methode „*Semi-Dry-Blotting*“ transferiert. Als Erstes wurden das Gel sowie vier Lagen extra dickes Western Blot-Papier für 10 min in Transferpuffer equilibriert und die PVDF-Membran für 30 s in Methanol aktiviert. Anschließend wurde auch die aktivierte PVDF-Membran im Transferpuffer für 8 Minuten inkubiert. Auf die Anodenseite des Transferapparates wurden zwei Lagen Western Blot-Papier folgend von dem Gel, der Membran sowie abschließend von zwei Lagen Western Blot-Papier luftblasenfrei aufeinander gelegt. Danach wurde die Transferapparatur mit einem Kathodendeckel verschlossen und der Transfer wurde $\ddot{u}N$ bei 8V und 4°C durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran $\ddot{u}N$ bei 4°C oder 3 h bei RT in 5 % BSA/TBST inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Anschließend erfolgte der Immunnachweis der Proteine mit spezifischen Antikörpern.

2.2.3.9 Immunnachweis von Proteinen

Die geblockte Membran wurde über Nacht bei 4°C mit einem Primärantikörper, der in 5 % BSA/TBST gelöst war, unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran 3x 10 min mit 1x TBST gewaschen und der Sekundärantikörper, zuvor 1:10000 in 5 % BSA/TBST verdünnt, auf die Membran gegeben und 1,5 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde die Membran wieder 3x 10 min gewaschen und auf einen Odyssey Scanner gelegt und die Fluoreszenz wurde bei einer spezifischen Wellenlänge (α -Kaninchen bei 700 nm, α -Maus bei 800 nm) gemessen. Alternativ wurde die Membran mit einem 1:5000 verdünnten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1,5 h bei RT inkubiert und anschließend ebenfalls 3x für 10 min mit 1x TBST gewaschen sowie mit einem ECL-Substrat (1:1 Mischung mit *Peroxide Solution* und *Luminol Enhancer Solution*) versehen und darauffolgend wurden die Proteine in einer Entwicklermaschine detektiert. Die erhaltenen Proteinbanden wurden mit dem Programm ImageJ quantifiziert und als relative Proteinexpression in *arbitrary*

units (au) angegeben. Die Normalisierung der Proteine erfolgte mit dem Referenzprotein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

2.2.3.10 Antikörper-Ablösung

Für die Antikörper-Ablösung von der Membran wurde ein 6M Guanidinhydrochlorid-Puffer benutzt [335]. Die Prozedur ist abhängig von der Stärke der Bindung des Primärantikörpers an das Protein. Daher wurde jedes Ablösen der Antikörper spezifisch getestet, d.h. wie lange es dauerte die Antikörper vollständig vom Protein auf der Membran zu lösen. Im Allgemeinen wurde die Membran mit dem Ablöse-Puffer unter dem Abzug bei RT geschüttelt (2x 5 min) und danach 4x 10 min mit 1x TBSN gewaschen. Dann wurde die Membran erneut mit dem spezifischen Sekundärantikörper versehen und danach erfolgte die Detektion der Proteine wie unter Punkt 2.2.3.9 beschrieben. War das Ablösen erfolgreich, waren keine Proteinbanden bzw. kein Signal mehr auf der Membran zu erkennen. Die Membran wurde dann 3x 10 min mit 1x TBST gewaschen und üN bei 4°C oder 3 h bei RT mit 5 % BSA/TBST inkubiert, bevor der neue Primärantikörper auf die Membran aufgebracht wurde.

2.2.3.11 Messung von Inflammationsparametern

Die Analyse einiger Inflammationsparameter im Blutplasma wurde mit Hilfe eines „*Milliplex Mouse Cytokine Kits*“ durchgeführt. Hierbei können Proteine in einem geringen Probenvolumen mittels Antikörper-gekoppelten- und Fluoreszenz-markierten *Beads* quantifiziert werden. Das Blutplasma wurde in diesem Experiment unverdünnt mit den Antikörper *Beads* und nach einigen Waschschritten mit Biotin-markierten Sekundärantikörpern sowie anschließend mit Streptavidin-Phycoerythrin inkubiert. Neben den Plasmaproben wurden Standards mit bekannter Konzentration und qualitative Kontrollen eingesetzt. Im Luminex 200™ wurden dann die Fluoreszenzfarbstoffe auf den *Beads* durch Laser angeregt, identifiziert und mittels internen Programms xPONENT quantifiziert. Folgende Cytokin-Konzentrationen, angegeben in pg/ml, wurden ermittelt: IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10 und TNF- α . Liegen die Werte unter dem niedrigsten Standard, wurden sie durch das verwendete Programm automatisch extrapoliert.

2.2.3.12 Histologie

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Skelettmuskeln und das Gehirn nach der Entnahme zunächst üN in 4 % Formaldehyd/PBS bei 4°C fixiert. Die Wirbelsäule mit dem enthaltenen Rückenmark wurde im Zamboni-Fixierpuffer bei 4°C üN inkubiert. Danach wurden die Gewebe in 70 % Ethanol überführt und bei RT gelagert. Im Anschluss wurden die Gewebeproben in einem Einbettcenter weiter verarbeitet. Es erfolgte die Entwässerung der Gewebe mit einer ansteigenden

Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %), die Überführung in einen Xylolersatzstoff (Neo-Clear[®]) mit anschließender Inkubation in 60°C heißem Paraffin. Die Proben wurden dann in Ausgussformen positioniert und mit Paraffin eingebettet und auf einer Kühlplatte ausgekühlt. Danach erfolgte die Anfertigung von 5 µm starken Gewebeschnitten mit einem Mikrotom, wobei die Schnitte auf Objektträger gebracht und für 2 h bei 60°C aufbewahrt wurden, um die Anheftung der Gewebe an den Objektträger zu gewährleisten. Im Anschluss konnten die Objekte bis zur Färbung bei RT gelagert werden. Für jede Färbung wurden die Proben zunächst in Neo-Clear[®] entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe (2x 100 %, 2x 96 %, 2x 70 %) rehydriert sowie anschließend in Bidest. kurz gewaschen.

2.2.3.12.1 Hämatoxylin Eosin Färbung

Die Hämatoxylin Eosin (HE) Färbung diente als Standardfärbung für die Untersuchung des Muskelfaserquerschnittes. Nach der Entparaffinierung und Rehydratation wurden die Skelettmuskeln mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Objektträger wurden für 5 min in *Mayers Hämatoxylin* inkubiert und anschließend 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Daraufhin erfolgte die Färbung für 5 min mit 1 % Eosin-Lösung. Des Weiteren wurden die Objekte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1x 70 %, 2x 96 %, 2x 100 %) inkubiert, in Neo-Clear[®] entfettet, mit Neo-Mount[®] eingedeckt sowie mit einem Deckglas verschlossen.

2.2.3.12.2 Vorbereitung der histologischen Rückenmark- und Gehirnschnitte

Für die Ermittlung der Anzahl an Motoneuronen und Gliazellen wurden Rückenmark- und Gehirn-Schnitte angefertigt. Die Wirbelsäule wurde zunächst in Thorax- und Lendenwirbel-Region getrennt und üN in Zamboni-Lösung fixiert. Dann wurde sie in 70 % Ethanol so lange gewaschen bis die Zamboni-Lösung vollständig entfernt war. Anschließend wurde die Lendenwirbelsäule vorsichtig vom Fleisch und Knochen befreit, bis das Rückenmark erschien. Für die Analysen wurde der L1-L2 Abschnitt der Lendenwirbelsäule benutzt (Abbildung 12).

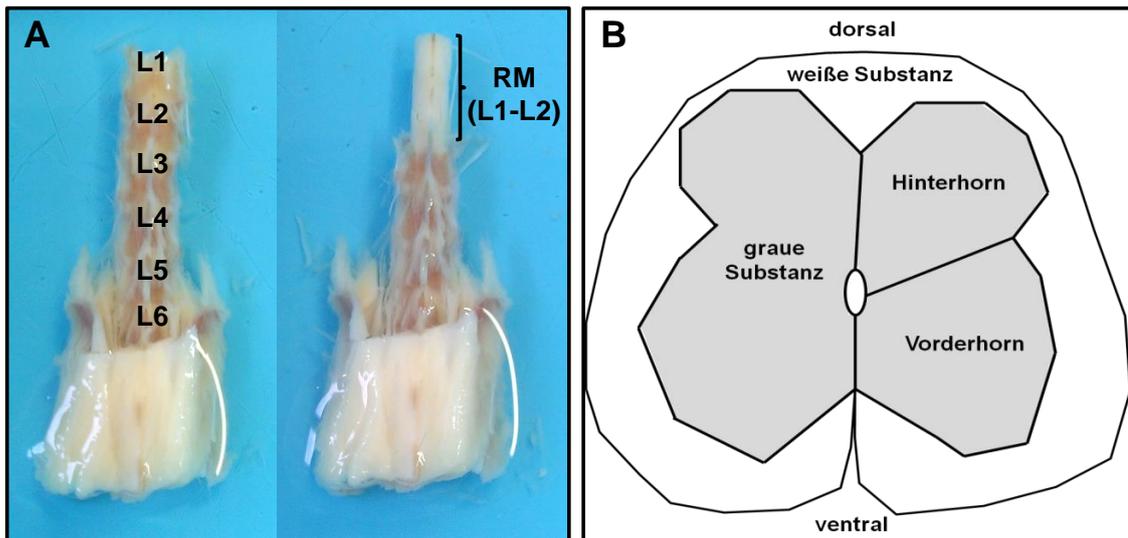


Abbildung 12: Sektion des Rückenmarks der lumbalen Wirbelsäule (A) und skizzierter Querschnitt des Rückenmarks (RM)

Die histologischen Untersuchungen im Gehirn wurden im primären Motorcortex durchgeführt. Der primäre Motorcortex dient der Ausführung des motorischen Programms. Bei der ALS ist diese motorische Aktivität gestört. Mit Hilfe eines Maus-Gehirnatlas [336] wurde die richtige Position des primären Motorcortex ermittelt. Für jede Auszählung wurde immer eine gleichgroße Fläche gewählt (Abbildung 13 roter Bereich).

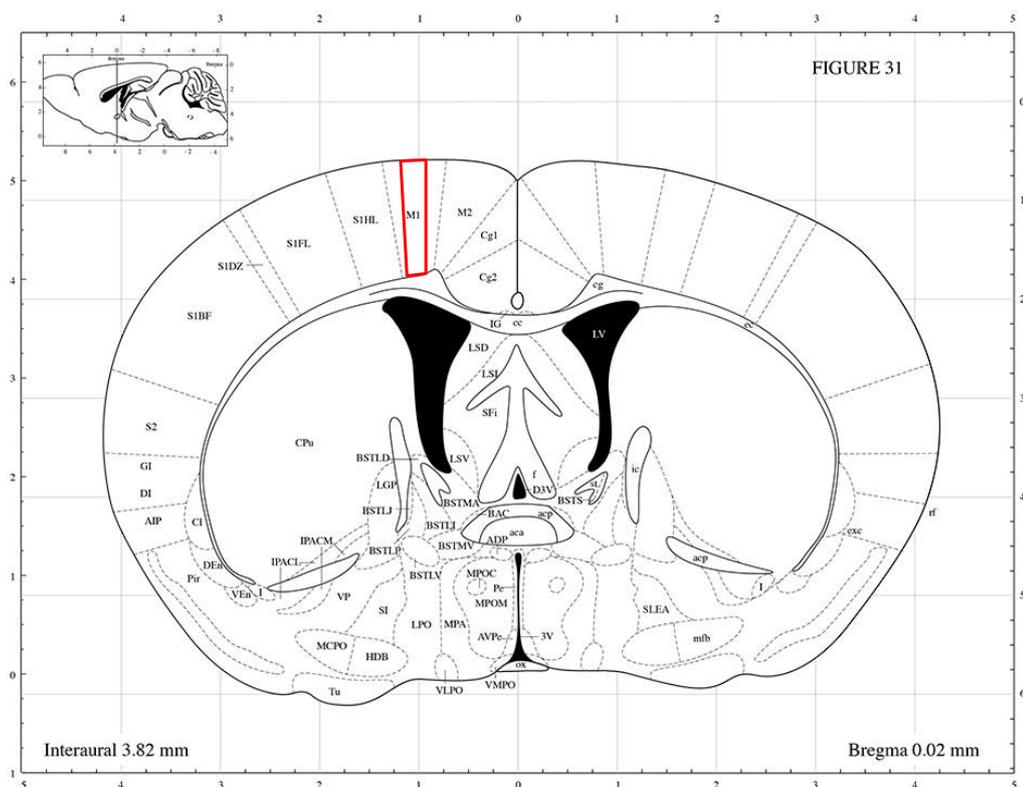


Abbildung 13: Querschnitt eines Mausgehirns aus dem Maus-Gehirnatlas nach Franklin und Paxinos [336]. Rot umrandeter Bereich im primären Motorcortex (M1) diente für die Zählung von Motoneuronen und Gliazellen.

2.2.3.12.3 Detektion von Motoneuronen und Gliazellen

Die Detektion von Motoneuronen und Astrozyten (Makrogliazellen) erfolgte in dieser Arbeit mit einer immunhistologischen Färbung. Bei einer immunhistologischen Färbung können spezifische Proteine bzw. Strukturen mit Hilfe von Antikörpern und der Kopplung einer Detektionslösung gezeigt werden. Die Anzahl der Motoneuronen wurde vom Vorder- als auch Hinterhorn der grauen Substanz und die Anzahl der Gliazellen von der weißen und grauen Substanz einer Hälfte des Rückenmarks bestimmt. Zum einen wurde ein spezifischer Antikörper, der die Cholin Acetyltransferase (ChAT) zeigt, verwendet. ChAT synthetisiert Acetylcholin in cholinerge Motoneuronen [337]. Daher gilt α -ChAT als spezifischer Motoneuronenmarker. Zum anderen wurde ein spezifischer Antikörper gegen das Saure Gliafaserprotein (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) benutzt, das überwiegend als Intermediärfilament-Bestandteil im Zytoplasma von Astrozyten vorkommt [338]. Des Weiteren ist bekannt, dass GFAP vermehrt in reaktiven Astrozyten vorkommt [339]. Daher gilt α -GFAP als spezifischer Marker für Astrozyten.

Für die Detektion von ChAT und GFAP wurden die Präparate mit Neo-Clear[®] entparaffiniert (3x 5 min) und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2x 100 %, 2x 96 %, 1x 70 %) rehydriert und anschließend in Bidest. gewaschen sowie 10 min in vorgewärmter Zitronensäure (pH 6,0) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation in Peroxidase Blocking Lösung mit anschließendem 3x Waschen in 1x PBS. Daraufhin wurden die Objekte für 1 h mit dem primären Antikörper in einer Feuchtekammer inkubiert und dann wieder 3x mit 1x PBS gewaschen. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit einem biotinyliertem sekundären Antikörper (α -Kaninchen). Nachdem die Präparate in 1x PBS gewaschen wurden, wurden sie für 30 min mit einer ABC-Peroxidase Lösung behandelt. Es entstand ein Avidin-Biotin-Complex (ABC), der anschließend mit einer DAB-Lösung zur Detektion von ChAT und GFAP führte. Nach erneutem Waschen wurden die Präparate mit Hämatoxylin gegengefärbt und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Neo-Mount[®] sowie einem Deckglas versehen.

Neben den Makrogliazellen (Astrozyten) wurden auch Mikrogliazellen untersucht. Für die Detektion der Mikrogliazellen wurde eine alt bewährte Methode angewendet, wobei ein biotinyliertes Lectin Ricinus Communis Agglutinin I (RCA-1) verwendet wurde [340]. Wie bereits oben beschrieben wurden die Präparate erst mit Neo-Clear[®] entparaffiniert (3x 5 min) und mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (2x 100 %, 2x 96 %, 1x 70 %). Anschließend wurden die Objekte 2x mit 1x TBST gewaschen und 10 min in einer Peroxidase-Lösung (0,03 % Wasserstoffperoxid) inkubiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt und die Präparate in Serum (1 % BSA/PBS) inkubiert. Nach

wiederholtem Waschen wurde das biotinylierte Lectin RCA-1 auf die Proben gegeben und für 1 h in einer Feuchtekammer bei RT belassen. Anschließend erfolgte die Detektion nach der ABC-Methode (siehe oben) und das Gegenfärben mit Hämatoxylin sowie das Abschließen der Objekte mit Neo-Mount®.

2.2.3.12.4 Mikroskopie und Auswertung

Von den gefärbten Schnitten wurden mit dem BZ-9000 Mikroskop von Keyence Bilder aufgenommen und die zugehörige Software wurde für die Analyse verwendet.

Der Muskelfaserquerschnitt wurde von den aufgenommenen HE-gefärbten Präparaten bei einer 20-fachen Vergrößerung ermittelt. Dabei wurde immer der größte Querschnitt, der orthogonal auf dem absolut größten Querschnitt steht, bestimmt. So konnten verschiedene Orientierungsmöglichkeiten (gerade und schiefe Schnitte) der Muskelfasern vereinheitlicht werden. Um eine möglichst genaue Messung zu erhalten, wurden außerdem mindestens 100 Fasern je Muskelpräparat vermessen [341]. Des Weiteren wurde der Anteil an unterschiedlich großen Muskelfasern ermittelt.

Die gefärbten Gehirn- und Rückenmarks-Schnitte wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen und die Anzahl der Motoneuronen und Gliazellen mithilfe der Software bestimmt.

2.2.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad PRISM 5.0 verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (engl. *standard error of the mean*, SEM) angegeben. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant angesehen. Das Überleben der Tiere wurde in einer Überlebenskurve nach Kaplan Meier zusammengefasst und mittels Cox-Regression ausgewertet. Mit dem Kolmogorov Smirnov Test wurden die Ergebnisse auf Normalverteilung getestet, wobei normalverteilte Daten mit ANOVA gefolgt von Student T-Test und nicht normalverteilte Daten mit Kruskal-Wallis und Mann Whitney U-Test analysiert wurden.

3 ERGEBNISSE

Als Erstes wurde in dieser Arbeit das G93A-SOD1-Mausmodell in Hinsicht auf Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Muskelgewichte in Abhängigkeit zum Krankheitsverlauf charakterisiert (Verlaufsstudie). Im Anschluss wurden Effekte einer β -Blocker-Behandlung auf die Krankheitsentwicklung, das Körpergewicht, die Körperzusammensetzung sowie auf die Muskelgewichte und der Einfluss auf das Überleben untersucht (Überlebensstudie). Außerdem wurde eine Studie durchgeführt, in der die Versuchstiere zu einem definierten Zeitpunkt euthanasiert wurden, um den Behandlungseinfluss besser vergleichen zu können (Vergleichsstudie). In der Vergleichsstudie wurde analysiert, ob die Behandlung einen Einfluss auf das Körpergewicht, die Körperzusammensetzung sowie auf die Skelettmuskelmasse nimmt. Des Weiteren wurde in diesem Zusammenhang die Atrophie im Skelettmuskel GC näher untersucht. Dabei wurden Komponenten des UPS, der Apoptose, der Autophagie und Inflammation untersucht. Weiterhin wurde mit Hilfe mikroskopischer Untersuchungen ermittelt, ob die Behandlung eine Wirkung auf die Motoneuronenzahl im primären Motorcortex und im lumbalen Rückenmark zeigt.

3.1 Verlaufsstudie - Phänotypische Charakterisierung der ALS/Kachexie

Für die phänotypische Charakterisierung der ALS und der Kachexie im G93A-SOD1-Mausmodell wurden die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten (vor der ALS, 10-, 20-, 30-, 41-Tage nach Erstsymptomatik, final) hinsichtlich der Veränderung ihres Körpergewichtes, ihrer Körperzusammensetzung (Fett, fettfreie Masse) und der Gewichte ihrer Skelettmuskeln, sowie des BAT und des Herzens untersucht. Es werden die Gewichtsdaten am Ende der Studie sowie die Veränderung (Δ) der Gewichte, d.h. der Unterschied des Endgewichtes zum Ausgangsgewicht dargestellt.

3.1.1 Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Muskelgewichte

Zu Beginn der Verlaufsstudie (Basis) waren das Körpergewicht, die Fettmasse und die fettfreie Masse der ALS-Tiere bei allen Gruppen gleich (Tabelle 18).

Tabelle 18: Körpergewicht, Fettmasse und fettfreie Masse zu Beginn der Verlaufsstudie (Basis). Angaben als Mittelwert \pm SEM.

| Tage nach Erstsymptomatik | 0 | 10 | 20 | 30 | 41 | final |
|----------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Tiere [n] | 57 | 27 | 27 | 29 | 16 | 26 |
| Basis-Körpergewicht [g] | 23,8 \pm 0,5 | 23,2 \pm 0,6 | 22,4 \pm 0,5 | 23,4 \pm 0,7 | 23,3 \pm 0,9 | 23,9 \pm 0,6 |
| Basis-Fettmasse [g] | 2,3 \pm 0,1 | 2,3 \pm 0,1 | 2,4 \pm 0,2 | 2,2 \pm 0,1 | 2,1 \pm 0,2 | 2,9 \pm 0,2 |
| Basis-fettfreie Masse [g] | 18,9 \pm 0,4 | 18,5 \pm 0,5 | 17,9 \pm 0,4 | 18,9 \pm 0,6 | 18,8 \pm 0,9 | 18,9 \pm 0,5 |

Die ALS-Tiere haben von Tag 0 bis 20 Tage nach Erstsymptomatik an Körpergewicht zugenommen (Abbildung 14A). Das Körpergewicht der Tiere am Tag 0 stieg um 3,8 % bis zum Zeitpunkt 20 Tage nach Erstsymptomatik (Abbildung 14B). Die ALS-Mäuse verloren ab 30 Tage nach Erstsymptomatik bis zum Erreichen des finalen Zustands stetig an Körpergewicht. ALS-Tiere 41 Tage nach Erstsymptomatik wiesen eine signifikante Reduzierung des Körpergewichtes, im Vergleich zum Ausgangsgewicht, auf (Abbildung 14B, $p=0,0154$ 41 Tage vs. 0 Tage nach Erstsymptomatik). Diese Tiere verloren 4,9 % ihres anfänglichen Körpergewichtes (Abbildung 14B). ALS-Tiere im finalen Zustand haben bis zum Ende der Studie signifikant an Körpergewicht verloren (Abbildung 14A, $p<0,0001$, final vs. 0 Tage nach Erstsymptomatik). Das Anfangsgewicht der ALS-Tiere hat sich bis zum finalen Zustand signifikant um 23,4 % reduziert (Abbildung 14B, $p=0,0007$, final vs. 0 Tage nach Erstsymptomatik).

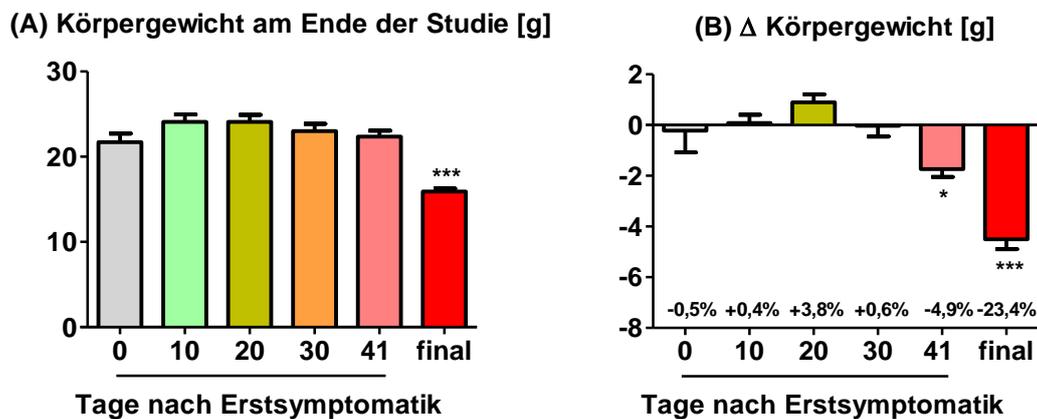


Abbildung 14: Körpergewicht in der Verlaufsstudie. (A) Körpergewicht [g] am Ende der Studie und (B) Veränderung (Δ) des Körpergewichtes [g]. Angaben als Mittelwert \pm SEM. Bei Graph (B) ist die Änderung des Körpergewichtes im Vergleich zum Ausgangsgewicht in % angegeben. *: $p<0,05$, ***: $p<0,001$ vs. ALS-Tiere 0 Tage nach Erstsymptomatik.

Neben dem Körpergewicht wurde die Körperzusammensetzung der ALS-Tiere untersucht. Der Fettanteil der Tiere vor Erstsymptomatik bis 10 Tage nach Erstsymptomatik reduzierte sich bis zum Ende der Studie (Abbildung 15A). Tiere vor der Erstsymptomatik verloren 26,7 % ihrer Ausgangsfettmasse (Abbildung 15B). Die Fettmasse der Tiere aus der Gruppe 20 Tage nach Erstsymptomatik war am Ende der Studie erhöht (Abbildung 15A). Sie nahmen 21,7 % an Fettmasse zu (Abbildung 15B). Tiere ab 30 Tage nach Erstsymptomatik zeigten im Vergleich zu den Tieren, die noch keine ALS-Symptomatik aufwiesen, eine signifikante Fettmassenreduktion am Ende der Studie (Abbildung 15A, 30 Tage nach Erstsymptomatik: $p=0,0172$, 41 Tage nach Erstsymptomatik: $p=0,0348$, final: $p<0,0001$, alle vs. 0 Tage nach Erstsymptomatik). Die Tiere aus der Gruppe 30 Tage nach Erstsymptomatik verloren 10,5 % ihres Ausgangsgewichtes und Tiere 41 Tage nach Erstsymptomatik 7,4 % ihres

Anfangsgewichtes (Abbildung 15B). Tiere im finalen Zustand verloren 65,8 % ihrer Fettmasse zu Beginn der Studie (Abbildung 15B). Die Gruppen 10-, 20-, 30-, und 41-Tage nach Erstsymptomatik verloren signifikant weniger Fettmasse als die Tiere ohne Erstsymptomatik, was kontrovers erscheint (Abbildung 15B). Es könnte aber sein, dass die Tiere ohne Erstsymptomatik aktiver waren als die anderen Gruppen mit Erstsymptomatik und deshalb mehr Ausgangsfettmasse verloren haben. Jedoch reduzierte sich die Änderung der Fettmasse der Tiere im finalen Zustand, im Vergleich zu den Tieren ohne Erstsymptomatik, signifikant (Abbildung 15B: $p=0,0051$, final vs. 0 Tage nach Erstsymptomatik).

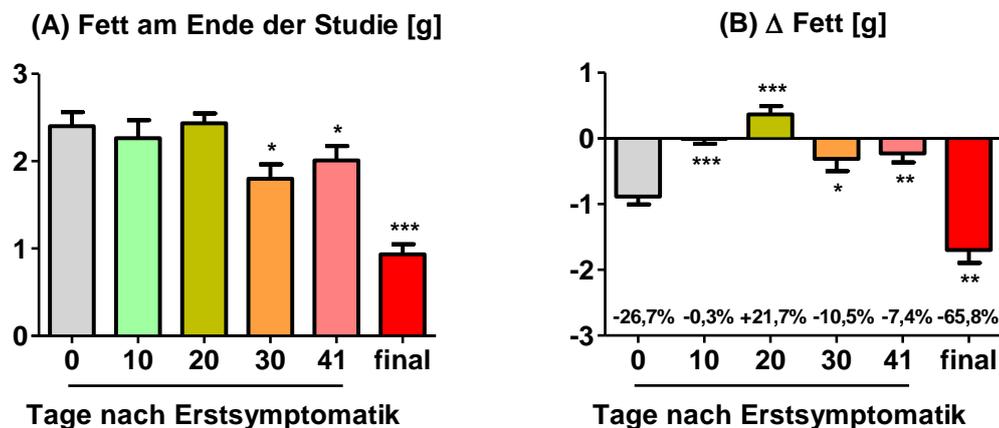


Abbildung 15: Fettmasse in der Verlaufsstudie. (A) Fettmasse [g] am Ende der Studie und (B) Veränderung (Δ) der Fettmasse. Angaben als Mittelwert \pm SEM. Bei Graph (B) ist die Änderung der Fettmasse im Vergleich zur Anfangsfettmasse in % angegeben. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$ vs. ALS-Tiere 0 Tage nach Erstsymptomatik.

Die fettfreie Masse, d.h. die Muskelmasse sowie die Masse der Organe, wurde ebenfalls bestimmt. Bis 20 Tage nach Erstsymptomatik wurde eine Steigerung der fettfreien Masse am Ende der Studie beobachtet (Abbildung 16A). Ab 30 Tage nach Erstsymptomatik kam es zu einer Verminderung der fettfreien Masse bis zur finalen Stufe, bei der eine signifikante Abnahme der fettfreien Masse festzustellen war (Abbildung 16A, $p=0,0003$, final vs. 0 Tage nach Erstsymptomatik). Die Veränderung der fettfreien Masse ist ab 41 Tage nach Erstsymptomatik signifikant reduziert, wobei die Tiere 7,9 % ihrer fettfreien Masse zu Beginn verloren, im finalen Zustand kam es zu einer signifikanten Abnahme um 24,5 % (Abbildung 16B; 41 Tage nach Erstsymptomatik: $p=0,0003$; final: $p<0,0001$, beide vs. 0 Tage nach Erstsymptomatik).

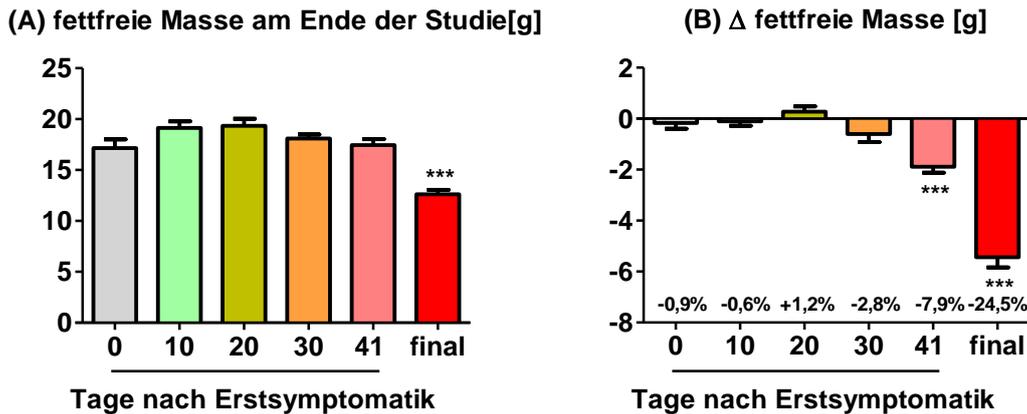


Abbildung 16: Fettfreie Masse in der Verlaufsstudie. (A) Fettfreie Masse [g] am Ende der Studie und (B) Veränderung (Δ) der fettfreien Masse. Angaben als Mittelwert \pm SEM. Bei Graph (B) ist die Änderung der Fettmasse im Vergleich zur Basislinie in % angegeben. ***: $p < 0,001$ vs. ALS-Tiere 0 Tage nach Erstsymptomatik.

Für die weitere Charakterisierung des Krankheitsverlaufes der ALS wurde die Herzmasse, das Gewicht des BAT, sowie die Massen der Skelettmuskeln GC, Soleus, TA und EDL ermittelt (Abbildung 17). Bezüglich der Herzmasse konnte keine signifikante Veränderung im Verlauf der ALS festgestellt werden (Abbildung 17A). Das BAT-Gewicht reduzierte sich im finalen Zustand, im Vergleich zu den Tieren 0 Tage nach Erstsymptomatik, signifikant (Abbildung 17B, $p = 0,0110$). Im GC kam es, verglichen zu den Tieren 0 Tage nach Erstsymptomatik, zu einer signifikanten Abnahme der Masse in der Gruppe 41 Tage nach Erstsymptomatik sowie bei den Tieren im finalen Zustand (Abbildung 17C, 41 Tage nach Erstsymptomatik: $p = 0,0002$; final: $p < 0,0001$, beide vs. 0 Tage nach Erstsymptomatik). Das Gewicht des Soleus, des TA sowie des EDL hat sich bei den Tieren im finalen Zustand, im Vergleich zu den Tieren 0 Tage nach Erstsymptomatik, signifikant verringert (Abbildung 17D, Soleus: $p = 0,0068$; Abbildung 17E, TA: $p = 0,0181$; Abbildung 17F, EDL: $p = 0,0431$).

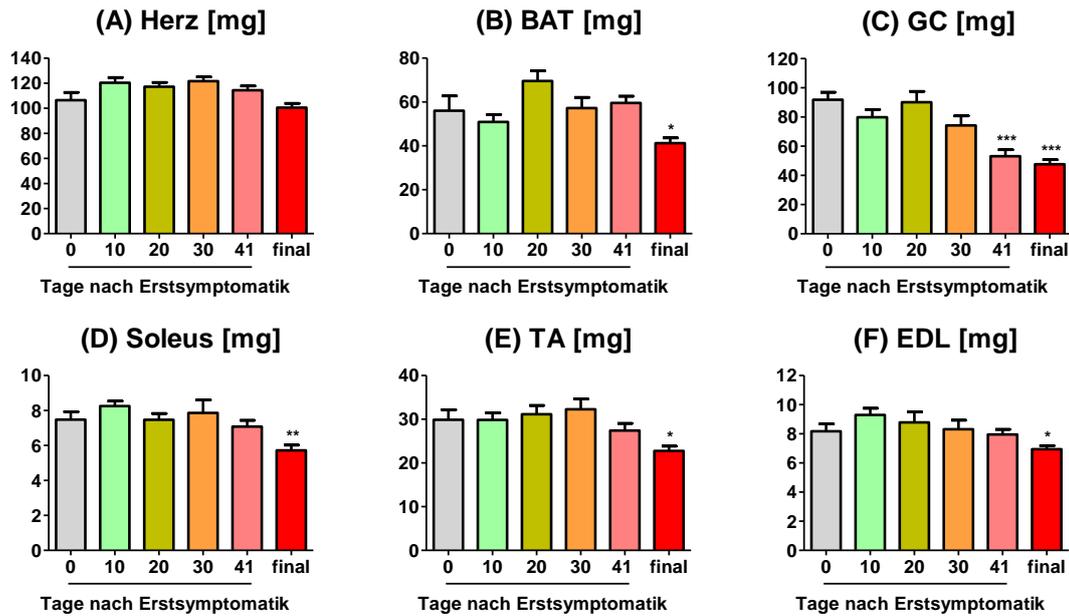


Abbildung 17: Muskelgewichte in der Verlaufsstudie. (A) Herz, (B) BAT, (C) GC, (D) Soleus, (E) TA, (F) EDL. Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. ALS-Tiere 0 Tage nach Erstsymptomatik. BAT= Braunes Fettgewebe, GC= *Musculus gastrocnemius*, TA= *Musculus tibialis anterior*, EDL= *Musculus extensor digitorum longus*.

Die Ergebnisse der gemessenen Organgewichte in der Verlaufsstudie sind in Tabelle 31 im Anhang dargestellt.

3.2 Überlebensstudie - Behandlungseffekte auf die Entwicklung der ALS

In den folgenden Abschnitten wurde der Effekt der pharmakologischen Behandlung mit β -Blockern (Propranolol, Oxprenolol, je zwei Dosen *R*- und *S*-Oxprenolol) auf die ALS-Progression, das Körpergewicht, die Körperzusammensetzung sowie auf die Skelett- und Herzmuskelmasse und abschließend auf das Überleben untersucht.

3.2.1 Progression

Die Untersuchung der ALS-Krankheitsentwicklung erfolgte mit Hilfe der Kaplan-Meier-Darstellung. Das Fortschreiten der ALS wurde als mittlere Progression angegeben. Die ALS-Progression von Stufe 1 zu Stufe 2 wurde bei den Tieren durch die Behandlung mit beiden Dosen *R*- und *S*-Oxprenolol, im Vergleich zu den Placebotieren, signifikant verlangsamt (Abbildung 18A, Tabelle 19). Bei Tieren, die mit *R*- und *S*-Oxprenolol behandelt wurden, dauerte es, verglichen mit Placebotieren, durchschnittlich 5-6 Tage länger bis sie Stufe 2 der ALS erreichten (Tabelle 19). Betrachtet man die Geschlechter einzeln, so zeigten die Männchen nach Behandlung mit den β -Blockern keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Placebotieren (Abbildung 18B). Bei den weiblichen Tieren hingegen verlangsamte die Behandlung mit 30 mg/kg/d Oxprenolol als auch mit 10 mg/kg/d *R*-Oxprenolol signifikant die ALS-Progression von Stufe 1 zu Stufe 2 (Abbildung 18C). Mit durchschnittlich 9 Tagen

Verzögerung von Stufe 1 zu Stufe 2 hatte die Behandlung mit 10 mg/kg/d *R*-Oxprenolol, versus die weiblichen Placebos, den signifikantesten Einfluss (Tabelle 19). Weder die Behandlung der Männchen und Weibchen mit Rilutek noch mit Propranolol hatte, versus der Placebogruppe, einen Einfluss auf die Progression von Stufe 1 zu Stufe 2.

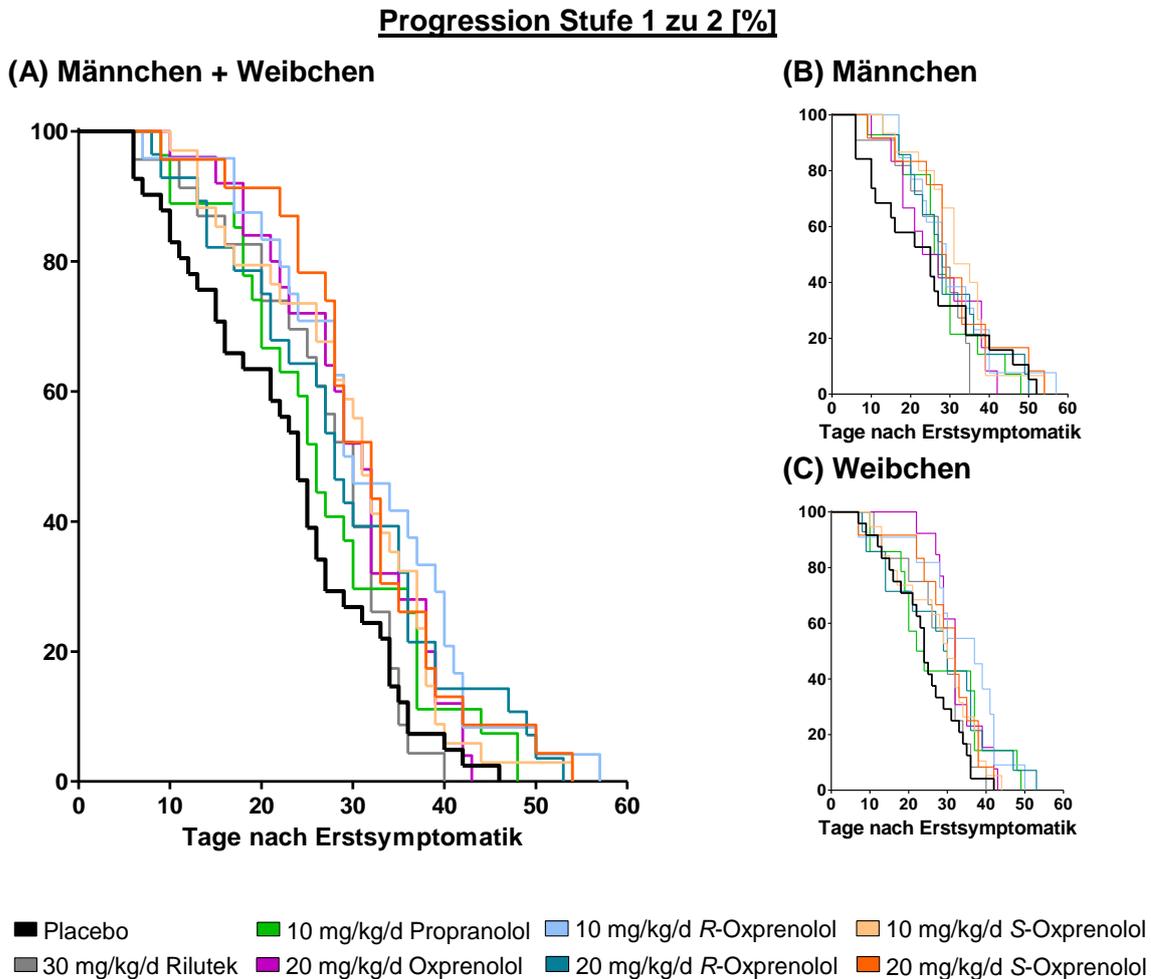


Abbildung 18: ALS-Progression von Stufe 1 zu 2. Behandlung mit Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), Propranolol (10 mg/kg/d), Oxprenolol (20 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). (A) Männchen und Weibchen, (B) Männchen und (C) Weibchen.

Tabelle 19 fasst die Untersuchungsergebnisse der ALS-Progression von Stufe 1 zu Stufe 2 der behandelten Tiergruppen mit Placebo, Rilutek und β -Blockern zusammen.

Tabelle 19: Ergebnisse der ALS-Progression von Stufe 1 zu 2. Behandlung mit Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), Propranolol (10 mg/kg/d), Oxprenolol (20 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ vs. Placebo.

| Behandlung | Tiere [n] | Mittlere Progression | Hazard Ratio | 95%CI | p-Wert |
|---------------------------------|-----------|----------------------|--------------|-----------|--------|
| Männchen + Weibchen | | | | | |
| Placebo | 41 | 24,2±1,8 | - | - | - |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 23 | 26,7±1,8 | 0,82 | 0,48-1,40 | 0,47 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 27 | 27,0±2,1 | 0,64 | 0,39-1,06 | 0,086 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 25 | 29,7±1,8 | 0,60 | 0,36-1,01 | 0,053 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 24 | 31,7±2,3** | 0,47 | 0,28-0,79 | 0,005 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 28 | 28,9±2,3* | 0,54 | 0,32-0,90 | 0,018 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 34 | 28,0±2,0* | 0,56 | 0,35-0,91 | 0,019 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 23 | 30,4±2,2* | 0,51 | 0,31-0,87 | 0,013 |
| Männchen | | | | | |
| Placebo | 20 | 24,2±3,5 | - | - | - |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 11 | 26,0±2,7 | 1,07 | 0,47-2,42 | 0,88 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 14 | 27,9±2,7 | 0,97 | 0,47-2,03 | 0,94 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 12 | 26,7±3,1 | 1,07 | 0,49-2,33 | 0,87 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 13 | 30,3±3,1 | 0,71 | 0,34-1,48 | 0,36 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 14 | 29,4±3,0 | 0,84 | 0,41-1,74 | 0,64 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 15 | 31,8±2,6 | 0,67 | 0,33-1,37 | 0,27 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 11 | 30,9±3,6 | 0,66 | 0,31-1,40 | 0,28 |
| Weibchen | | | | | |
| Placebo | 21 | 24,3±1,9 | - | - | - |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 12 | 27,4±2,6 | 0,78 | 0,39-1,60 | 0,50 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 13 | 27,6±3,4 | 0,56 | 0,27-1,14 | 0,11 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 13 | 32,5±1,7* | 0,46 | 0,23-0,93 | 0,031 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 11 | 33,4±3,6** | 0,37 | 0,18-0,78 | 0,009 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 14 | 28,4±3,7 | 0,55 | 0,28-1,11 | 0,096 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 19 | 27,9±2,4 | 0,62 | 0,33-1,17 | 0,14 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 12 | 29,9±2,7 | 0,56 | 0,27-1,14 | 0,11 |

Die Behandlung der Männchen mit Rilutek, Oxprenolol sowie beiden Dosen *R*- sowie *S*-Oxprenolol zeigten, im Vergleich zu den Placebotieren, eine signifikante Verzögerung der ALS-Progression von Stufe 1 zu Stufe 3 (Abbildung 19B, Tabelle 20). Die Behandlung der Männchen mit Oxprenolol und den höheren Dosen *R*- und *S*-Oxprenolol erzielten, verglichen mit Placebos, mit 19 Tagen Verzögerung der mittleren Progression von Stufe 1 zu Stufe 3 die stärksten Effekte (Abbildung 19B, Tabelle 20). Im Gegensatz dazu hatte weder die Rilutek- noch die β -Blocker-Behandlung der weiblichen Tiere, versus der Placebogruppe, eine signifikante Verlangsamung der ALS-Progression von Stufe 1 zu Stufe 3 zur Folge (Abbildung 19C, Tabelle 20). Jedoch kann festgehalten werden, dass die Behandlung mit 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol die besten Ergebnisse bei den Weibchen erzielte (Abbildung 19C, Tabelle 20). So wurde die ALS-Progression von Stufe 1 zu Stufe 3, bei den Männchen und Weibchen zusammen betrachtet, durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol signifikant

um 10 Tage verzögert (Abbildung 19A). Die Behandlung der männlichen und weiblichen Tiere mit Propranolol versus Placebos besaß keinen Einfluss auf die ALS-Progression von Stufe 1 zu Stufe 3 (Abbildung 19, Tabelle 20).

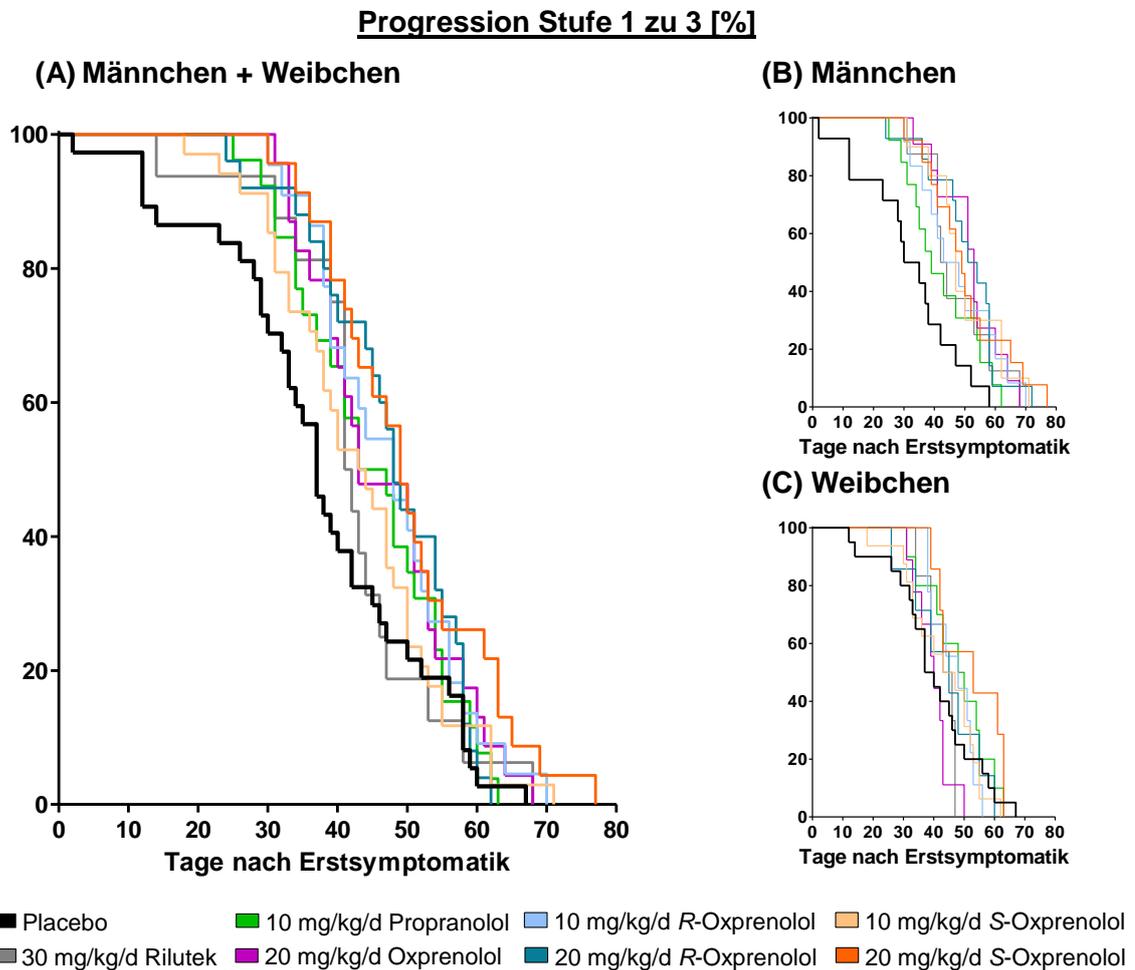


Abbildung 19: ALS-Progression von Stufe 1 zu Stufe 3. Behandlung mit Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), Propranolol (10 mg/kg/d), Oxprenolol (20 mg/kg/d), R-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d) und S-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). (A) Männchen und Weibchen, (B) Männchen und (C) Weibchen zeigt.

In Tabelle 20 sind die Ergebnisse der ALS-Progression von Stufe 1 zu Stufe 3 der behandelten Tiergruppen mit Placebo, Rilutek und β -Blockern zusammengefasst.

Tabelle 20: Ergebnisse der ALS-Progression von Stufe 1 zu 3. Behandlung mit Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), Propranolol (10 mg/kg/d), Oxprenolol (20 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ vs. Placebo.

| Behandlung | Tiere [n] | Mittlere Progression | Hazard Ratio | 95%CI | p-Wert |
|---------------------------------|-----------|----------------------|--------------|-----------|--------|
| Männchen + Weibchen | | | | | |
| Placebo | 37 | 39,5±2,7 | - | - | - |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 16 | 44,4±3,2 | 0,76 | 0,42-1,37 | 0,84 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 26 | 46,6±2,4 | 0,72 | 0,43-1,21 | 0,21 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 23 | 48,0±2,5 | 0,60 | 0,35-1,01 | 0,055 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 22 | 47,6±2,3 | 0,60 | 0,35-1,02 | 0,060 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 25 | 48,5±2,2 | 0,63 | 0,37-1,07 | 0,086 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 34 | 43,1±2,1 | 0,73 | 0,45-1,20 | 0,22 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 23 | 49,3±2,5** | 0,47 | 0,28-0,81 | 0,006 |
| Männchen | | | | | |
| Placebo | 17 | 31,8±4,2 | - | - | - |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 9 | 47,3±4,1* | 0,40 | 0,16-0,99 | 0,049 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 13 | 42,3±3,4 | 0,50 | 0,22-1,14 | 0,099 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 11 | 51,6±3,2** | 0,24 | 0,10-0,61 | 0,002 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 12 | 47,6±3,8* | 0,34 | 0,14-0,82 | 0,016 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 14 | 50,5±3,2** | 0,25 | 0,10-0,63 | 0,003 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 16 | 49,7±3,8* | 0,31 | 0,12-0,76 | 0,011 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 12 | 50,4±3,7** | 0,31 | 0,13-0,74 | 0,008 |
| Weibchen | | | | | |
| Placebo | 20 | 40,1±3,2 | - | - | - |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 7 | 42,7±2,1 | 1,04 | 0,39-2,80 | 0,94 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 13 | 47,9±3,4 | 0,70 | 0,33-1,50 | 0,36 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 12 | 39,7±1,9 | 1,45 | 0,59-3,56 | 0,42 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 10 | 46,6±2,3 | 0,83 | 0,37-1,87 | 0,65 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 11 | 43,9±4,5 | 0,87 | 0,36-2,10 | 0,76 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 18 | 43,0±3,0 | 0,95 | 0,48-1,89 | 0,88 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 11 | 52,0±4,0 | 0,51 | 0,22-1,17 | 0,11 |

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Behandlung mit beiden Dosen *R*-Oxprenolol die Krankheitsentwicklung von Stufe 1 zu Stufe 2, versus Placebos, am stärksten verzögerte. Dieser positive Behandlungseffekt durch *R*-Oxprenolol wurde ebenso in der verzögerten ALS-Entwicklung von Stufe 1 zu Stufe 3 beobachtet. Außerdem ist anzumerken, dass die Behandlung mit 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol die stärkste Verlangsamung der ALS-Progression von Stufe 1 zu Stufe 3, versus Placebos, aufwies.

3.2.2 Überleben

Für die Analyse des Überlebens wurde die Darstellung nach Kaplan-Meier gewählt (Abbildung 20). Es wurde das mittlere und maximale Überleben nach Erstsymptomatik sowie nach Geburt in Tagen ermittelt.

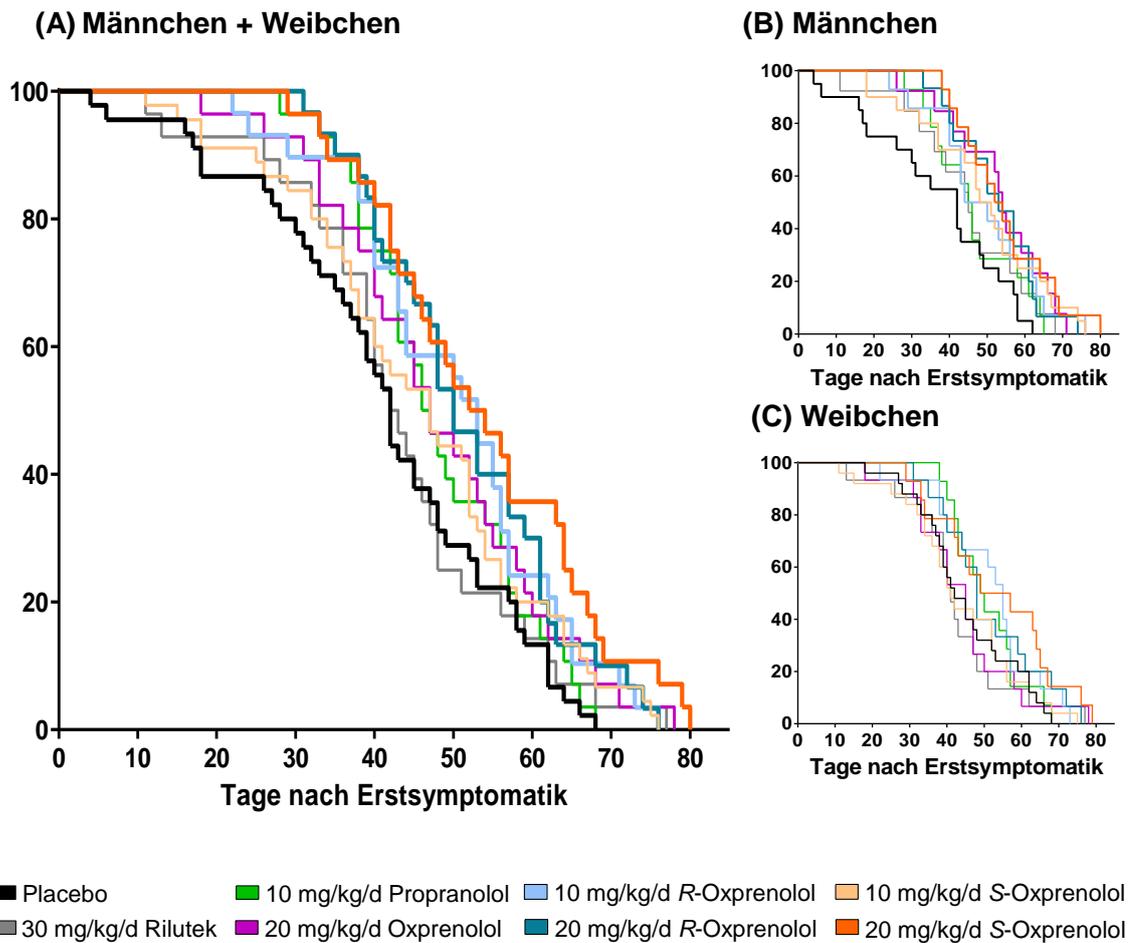
Überleben nach Erstsymptomatik [%]

Abbildung 20: Überleben (Kaplan-Meier-Kurve) nach Erstsymptomatik. Behandlung mit Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), Propranolol (10 mg/kg/d), Oxprenolol (20 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). (A) Männchen und Weibchen, (B) Männchen, (C) Weibchen.

Die Männchen zeigten durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d Oxprenolol und mit beiden Dosierungen *R*- sowie *S*-Oxprenolol, im Vergleich zu den Placebotieren, ein signifikant verlängertes Überleben (Abbildung 20B, Tabelle 21). Die Behandlung der Männchen mit den jeweils höheren Dosen des *R*- und *S*-Oxprenolols erhöhte die mittlere Überlebensrate der Tiere, verglichen mit Placebos, am stärksten (Abbildung 20B). Die Behandlung mit 30 mg/kg/d Rilutek und mit 10 mg/kg/d Propranolol zeigte, im Vergleich zu Placebotieren, keinen signifikanten Effekt auf das Überleben der Männchen. Bei den Weibchen erhöhte sich das mittlere Überleben durch die Behandlung mit beiden Dosen *R*-Oxprenolol und mit der höheren Dosis *S*-Oxprenolol, im Vergleich zur Placebogruppe, am stärksten (Abbildung 20C). Allerdings kam es bei den Weibchen zu keiner signifikanten Steigerung des Überlebens, im Vergleich zur Placebogruppe, durch die Behandlungen (Abbildung 20C). Betrachtet man die

Männchen und Weibchen zusammen, so wurde das Überleben der Tiere durch die Behandlung mit beiden Dosen *R*-Oxprenolol und der höheren Dosis *S*-Oxprenolol, im Vergleich zu Placebotieren, signifikant verlängert (Tabelle 21). ALS-Tiere, die mit 30 mg/kg/d Rilutek, 10 mg/kg/d Propranolol, 20 mg/kg/d Oxprenolol und 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol behandelt wurden, zeigten zwar im Vergleich zur Placebogruppe eine Verbesserung des mittleren Überlebens, jedoch keine signifikanten Effekte (Tabelle 21).

Tabelle 21: Ergebnisse der Überlebensanalyse (Kaplan-Meier-Kurve) nach Erstsymptomatik. Behandlung mit Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), Propranolol (10 mg/kg/d), Oxprenolol (20 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Angaben des maximalen und mittleren Überlebens in Tagen nach Erstsymptomatik. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ vs. Placebo.

| Behandlung | Tiere [n] | Maximales Überleben [Tage] | Mittleres Überleben [Tage] | Hazard Ratio | 95%CI | p-Wert |
|---------------------------------|-----------|----------------------------|----------------------------|--------------|-----------|--------|
| Männchen + Weibchen | | | | | | |
| Placebo | 45 | 68 | 41,3±2,3 | - | - | - |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 28 | 77 | 43,3±2,8 | 0,89 | 0,55-1,46 | 0,65 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 28 | 68 | 48,5±2,0 | 0,73 | 0,45-1,18 | 0,20 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 28 | 78 | 48,2±2,7 | 0,66 | 0,40-1,07 | 0,09 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 29 | 76 | 50,5±2,6* | 0,57 | 0,35-0,93 | 0,023 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 30 | 76 | 51,8±2,2* | 0,54 | 0,34-0,88 | 0,013 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 45 | 76 | 45,8±2,4 | 0,71 | 0,46-1,10 | 0,13 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 28 | 80 | 53,9±2,7** | 0,45 | 0,27-0,73 | 0,0014 |
| Männchen | | | | | | |
| Placebo | 20 | 62 | 36,9± 4,0 | - | - | - |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 13 | 68 | 44,2± 4,3 | 0,63 | 0,30-1,29 | 0,21 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 14 | 65 | 46,2± 3,2 | 0,59 | 0,29-1,21 | 0,15 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 13 | 71 | 52,9± 3,7* | 0,38 | 0,18-0,80 | 0,011 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 14 | 76 | 49,1± 3,9* | 0,49 | 0,23-0,99 | 0,049 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 15 | 74 | 52,5± 2,9* | 0,41 | 0,19-0,86 | 0,017 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 20 | 76 | 48,5± 3,8* | 0,46 | 0,23-0,92 | 0,029 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 14 | 80 | 54,4± 3,3* | 0,39 | 0,19-0,83 | 0,014 |
| Weibchen | | | | | | |
| Placebo | 25 | 68 | 44,8±2,6 | - | - | - |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 15 | 77 | 42,5±3,8 | 1,08 | 0,55-2,15 | 0,82 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 14 | 68 | 50,7±2,5 | 0,71 | 0,36-1,39 | 0,32 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 15 | 78 | 44,2±3,7 | 1,03 | 0,52-2,02 | 0,94 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 15 | 73 | 51,7±3,5 | 0,60 | 0,31-1,15 | 0,13 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 15 | 76 | 51,1±3,5 | 0,41 | 0,31-1,16 | 0,13 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 25 | 75 | 43,7±3,1 | 0,96 | 0,53-1,73 | 0,89 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 14 | 79 | 53,4±4,3 | 0,53 | 0,27-1,02 | 0,058 |

In Tabelle 22 wird das Überleben nach Geburt angegeben. Die mit Rilutek und β -Blocker-behandelten männlichen Tiere wiesen, verglichen mit Placebotieren, keine signifikanten Unterschiede bezüglich des mittleren Überlebens nach Geburt auf (Tabelle 22). Jedoch wurde das mittlere Überleben der weiblichen Tiere durch die

Behandlung mit Propranolol und den niedrigeren Dosen *R*- und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d) signifikant erhöht (Tabelle 22). Männchen und Weibchen zusammen betrachtet, zeigten durch die Behandlung mit beiden Dosen *S*-Oxprenolol, im Vergleich zur Placebogruppe, ein signifikant verlängertes Überleben nach Geburt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Ergebnisse der Überlebensanalyse (Kaplan-Meier-Kurve) nach Geburt. Behandlung mit Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), Propranolol (10 mg/kg/d), Oxprenolol (20 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). n=Anzahl der Tiere, Angaben des maximalen und mittlerern Überlebens in Tage nach Geburt. *: p<0,05, **: p<0,01 vs. Placebo.

| Behandlung | Tiere [n] | Maximales Überleben [Tage] | Mittleres Überleben [Tage] | Hazard Ratio | 95%CI | p-Wert |
|---------------------------------|-----------|----------------------------|----------------------------|--------------|-----------|--------|
| Männchen + Weibchen | | | | | | |
| Placebo | 45 | 152 | 131,7±1,6 | | | |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 28 | 153 | 129,2±2,3 | 1,16 | 0,68-1,97 | 0,59 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 28 | 148 | 133,7±1,7 | 0,81 | 0,49-1,35 | 0,42 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 28 | 160 | 130,4±2,2 | 1,05 | 0,63-1,76 | 0,84 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 29 | 157 | 133,6±2,4 | 0,67 | 0,40-1,13 | 0,14 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 30 | 155 | 134,6±1,9 | 0,69 | 0,42-1,16 | 0,16 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 45 | 157 | 136,1±2,5** | 0,47 | 0,28-0,80 | 0,005 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 28 | 165 | 137,1±2,1* | 0,53 | 0,31-0,89 | 0,016 |
| Männchen | | | | | | |
| Placebo | 20 | 149 | 128,3±3,1 | | | |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 13 | 135 | 124,8±3,3 | 1,63 | 0,72-3,71 | 0,24 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 14 | 148 | 128,1±2,3 | 1,29 | 0,62-2,72 | 0,49 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 13 | 148 | 126,6±2,9 | 1,44 | 0,66-3,14 | 0,36 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 14 | 145 | 126,9±3,0 | 1,27 | 0,59-2,73 | 0,54 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 15 | 143 | 131,1±2,9 | 0,73 | 0,35-1,56 | 0,42 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 20 | 157 | 133,3±4,1 | 0,49 | 0,23-1,05 | 0,067 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 14 | 148 | 135,6±2,3 | 0,63 | 0,30-1,32 | 0,22 |
| Weibchen | | | | | | |
| Placebo | 25 | 152 | 136,6±1,6 | | | |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 15 | 153 | 133,0±3,0 | 0,93 | 0,45-1,93 | 0,84 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 14 | 148 | 139,7±1,5* | 0,46 | 0,22-0,95 | 0,037 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 15 | 160 | 133,7±3,2 | 0,92 | 0,45-1,87 | 0,81 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 15 | 157 | 139,8±3,1* | 0,39 | 0,19-0,82 | 0,013 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 15 | 155 | 138,0±2,3 | 0,63 | 0,31-1,31 | 0,22 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 25 | 157 | 139,0±2,9* | 0,42 | 0,20-0,89 | 0,023 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 14 | 165 | 138,6±3,6 | 0,48 | 0,23-1,01 | 0,052 |

Summa summarum wurde festgestellt, dass das Überleben der ALS-Tiere durch die Behandlung mit beiden Dosen *R*- und *S*-Oxprenolol, im Vergleich zu den Placebotieren, signifikant verlängert wurde. Die Behandlung mit Rilutek, Propranolol und dem Oxprenolol-Razemat führte, in der Gesamtheit betrachtet, zu keiner erheblichen Überlebensverlängerung.

3.2.3 Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Muskelgewichte

Am Anfang der Überlebensstudie (Basis) besaßen die ALS-Tiere alle ein gleiches Körpergewicht und eine gleiche Fett- sowie fettfreie Masse (Tabelle 23), mit Ausnahme der Ausgangsfettmasse der kombinierten Männchen und Weibchen-Gruppe, die mit Rilutek behandelt wurden.

Tabelle 23: Körpergewicht, Fettmasse und fettfreie Masse zu Beginn der Überlebensstudie (Basis). Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. Placebo

| Behandlung | Basis-Körpergewicht [g] | Basis-Fett [g] | Basis-fettfreie Masse [g] |
|---------------------------------|-------------------------|----------------|---------------------------|
| Männchen und Weibchen | | | |
| Placebo | 23,1 \pm 0,6 | 2,5 \pm 0,2 | 18,3 \pm 0,5 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 24,3 \pm 0,6 | 3,1 \pm 0,2* | 18,9 \pm 0,4 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 23,9 \pm 0,6 | 2,6 \pm 0,2 | 18,3 \pm 0,8 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 23,3 \pm 0,5 | 2,3 \pm 0,1 | 18,7 \pm 0,5 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 23,7 \pm 0,6 | 2,5 \pm 0,1 | 18,9 \pm 0,5 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 23,0 \pm 0,6 | 2,4 \pm 0,1 | 18,3 \pm 0,5 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 23,4 \pm 0,7 | 2,5 \pm 0,2 | 18,6 \pm 0,5 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 23,8 \pm 0,7 | 2,4 \pm 0,1 | 19,1 \pm 0,5 |
| Männchen | | | |
| Placebo | 26,9 \pm 0,6 | 2,7 \pm 0,4 | 21,4 \pm 0,4 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 26,8 \pm 0,5 | 3,2 \pm 0,4 | 20,9 \pm 0,4 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 26,2 \pm 0,5 | 2,8 \pm 0,2 | 20,8 \pm 0,4 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 25,7 \pm 0,5 | 2,0 \pm 0,1 | 21,0 \pm 0,5 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 26,4 \pm 0,5 | 2,4 \pm 0,2 | 21,2 \pm 0,3 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 25,8 \pm 0,5 | 2,3 \pm 0,1 | 20,7 \pm 0,5 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 26,2 \pm 0,6 | 2,7 \pm 0,3 | 20,7 \pm 0,5 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 26,9 \pm 0,5 | 2,7 \pm 0,2 | 21,5 \pm 0,4 |
| Weibchen | | | |
| Placebo | 20,5 \pm 0,4 | 2,4 \pm 0,2 | 16,2 \pm 0,3 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 21,8 \pm 0,6 | 3,0 \pm 0,3 | 17,0 \pm 0,3 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 21,6 \pm 0,5 | 2,5 \pm 0,4 | 15,7 \pm 1,1 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 21,0 \pm 0,3 | 2,5 \pm 0,2 | 16,6 \pm 0,3 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 21,1 \pm 0,5 | 2,6 \pm 0,2 | 16,6 \pm 0,3 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 20,3 \pm 0,4 | 2,6 \pm 0,2 | 15,9 \pm 0,3 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 20,6 \pm 0,5 | 2,3 \pm 0,2 | 16,4 \pm 0,4 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 20,5 \pm 0,4 | 2,1 \pm 0,1 | 16,5 \pm 0,3 |

3.2.3.1 Körpergewicht

Die Veränderung des Körpergewichtes, während der Überlebensstudie, wurde durch die Subtraktion des Körpergewichtes am Tötungstag und des Anfangsgewichtes ermittelt (Δ Körpergewicht). Es wurden keine signifikanten Unterschiede des Δ Körpergewichtes am Ende der Studie durch die Behandlung mit Rilutek und β -Blockern, im Vergleich zur Placebogruppe, festgestellt (Tabelle 24). Jedoch war der tägliche Verlust des Körpergewichtes bei den Männchen durch die Behandlung mit Rilutek und den höheren Dosen *R*- und *S*-Oxprenolol signifikant geringer als bei den

Placebotieren (Tabelle 24). Bei den Weibchen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Placebogruppe und den anderen Behandlungsgruppen festgestellt. Allerdings war der Verlust an Körpermasse pro Tag in der kombinierten Männchen und Weibchen-Gruppe durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d S-Oxprenolol signifikant reduziert (Tabelle 24).

Tabelle 24: Körpergewicht in der Überlebensstudie. Behandlung mit Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), Propranolol (10 mg/kg/d), Oxprenolol (20 mg/kg/d), R-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d) und S-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. Placebo

| Δ Körpergewicht | Tiere [n] | pro Tag [g] | am Ende [g] | am Ende [%] |
|------------------------------|-----------|-----------------------|----------------|-------------|
| Männchen und Weibchen | | | | |
| Placebo | 47 | -0,1537 \pm 0,0222 | -5,5 \pm 0,3 | -23,8 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 30 | -0,1216 \pm 0,0152 | -5,1 \pm 0,3 | -21,0 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 29 | -0,1276 \pm 0,0106 | -5,9 \pm 0,4 | -24,7 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 27 | -0,1236 \pm 0,0123 | -5,6 \pm 0,5 | -24,0 |
| 10 mg/kg/d R-Oxprenolol | 25 | -0,1461 \pm 0,0111 | -6,4 \pm 0,4 | -27,0 |
| 20 mg/kg/d R-Oxprenolol | 28 | -0,1110 \pm 0,0094 | -5,2 \pm 0,4 | -22,6 |
| 10 mg/kg/d S-Oxprenolol | 39 | -0,1230 \pm 0,0116 | -5,4 \pm 0,4 | -23,1 |
| 20 mg/kg/d S-Oxprenolol | 27 | -0,0995 \pm 0,0097* | -5,6 \pm 0,5 | -23,5 |
| Männchen | | | | |
| Placebo | 20 | -0,2158 \pm 0,0364 | -6,8 \pm 0,5 | -25,3 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 13 | -0,1204 \pm 0,0180* | -5,9 \pm 0,4 | -22,0 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 15 | -0,1427 \pm 0,0158 | -6,1 \pm 0,5 | -23,3 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 13 | -0,1248 \pm 0,0206 | -5,9 \pm 0,8 | -23,0 |
| 10 mg/kg/d R-Oxprenolol | 13 | -0,1535 \pm 0,0161 | -6,5 \pm 0,7 | -24,6 |
| 20 mg/kg/d R-Oxprenolol | 15 | -0,1160 \pm 0,0137* | -5,5 \pm 0,6 | -21,3 |
| 10 mg/kg/d S-Oxprenolol | 17 | -0,1503 \pm 0,0145 | -6,6 \pm 0,6 | -25,2 |
| 20 mg/kg/d S-Oxprenolol | 15 | -0,1157 \pm 0,0126* | -6,4 \pm 0,7 | -23,8 |
| Weibchen | | | | |
| Placebo | 27 | -0,0973 \pm 0,0206 | -4,5 \pm 0,3 | -22,0 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 17 | -0,1229 \pm 0,0257 | -4,5 \pm 0,5 | -20,6 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 14 | -0,1113 \pm 0,0132 | -5,7 \pm 0,7 | -26,4 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 14 | -0,1225 \pm 0,0147 | -5,3 \pm 0,6 | -25,2 |
| 10 mg/kg/d R-Oxprenolol | 12 | -0,1374 \pm 0,0155 | -6,2 \pm 0,4 | -29,4 |
| 20 mg/kg/d R-Oxprenolol | 13 | -0,1052 \pm 0,0131 | -4,9 \pm 0,5 | -24,1 |
| 10 mg/kg/d S-Oxprenolol | 22 | -0,1033 \pm 0,0161 | -4,5 \pm 0,6 | -21,8 |
| 20 mg/kg/d S-Oxprenolol | 12 | -0,0820 \pm 0,0136 | -4,6 \pm 0,6 | -22,4 |

3.2.3.2 Fettmasse

In Tabelle 25 wird die Änderung der Fettmasse vom Anfang bis zum Ende der Überlebensstudie gezeigt (Δ Fettmasse). Die Behandlung mit Rilutek und den β -Blockern zeigte keine signifikanten Unterschiede der Fettmassenänderung am Ende der Überlebensstudie. Allerdings führte die Behandlung mit Rilutek, verglichen mit der Placebogruppe, in der kombinierten Männchen und Weibchen-Gruppe zu einer signifikanten Erhöhung des täglichen Fettmassen-Verlustes (Tabelle 25).

Tabelle 25: Fettmasse in der Überlebensstudie. Behandlung mit Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), Propranolol (10 mg/kg/d), Oxprenolol (20 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. Placebo.

| Δ Fettmasse | Tiere [n] | pro Tag [g] | am Ende [g] | am Ende [%] |
|---------------------------------|-----------|-----------------------|----------------|-------------|
| Männchen und Weibchen | | | | |
| Placebo | 46 | -0,0356 \pm 0,0038 | -1,6 \pm 0,1 | -64,0 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 33 | -0,0501 \pm 0,0061* | -1,9 \pm 0,2 | -61,3 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 29 | -0,0439 \pm 0,0055 | -1,8 \pm 0,2 | -69,2 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 28 | -0,0331 \pm 0,0026 | -1,5 \pm 0,1 | -65,2 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 27 | -0,0393 \pm 0,0042 | -1,7 \pm 0,2 | -68,0 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 28 | -0,0326 \pm 0,0030 | -1,6 \pm 0,1 | -66,7 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 41 | -0,0294 \pm 0,0037 | -1,3 \pm 0,1 | -52,0 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 27 | -0,0298 \pm 0,0036 | -1,6 \pm 0,2 | -66,7 |
| Männchen | | | | |
| Placebo | 21 | -0,0405 \pm 0,0068 | -1,7 \pm 0,3 | -63,0 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 15 | -0,0575 \pm 0,0113 | -2,1 \pm 0,2 | -65,6 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 15 | -0,0519 \pm 0,0069 | -2,0 \pm 0,3 | -71,4 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 14 | -0,0283 \pm 0,0031 | -1,3 \pm 0,1 | -65,0 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 14 | -0,0374 \pm 0,0064 | -1,6 \pm 0,2 | -66,7 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 15 | -0,0299 \pm 0,0035 | -1,5 \pm 0,2 | -65,2 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 20 | -0,0336 \pm 0,0057 | -1,4 \pm 0,2 | -51,9 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 15 | -0,0321 \pm 0,0054 | -1,8 \pm 0,3 | -66,7 |
| Weibchen | | | | |
| Placebo | 25 | -0,0332 \pm 0,0046 | -1,6 \pm 0,2 | -66,7 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 18 | -0,0422 \pm 0,0061 | -1,8 \pm 0,2 | -60,0 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 14 | -0,0310 \pm 0,0083 | -1,7 \pm 0,4 | -68,0 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 14 | -0,0375 \pm 0,0037 | -1,6 \pm 0,2 | -64,0 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 13 | -0,0414 \pm 0,0053 | -1,9 \pm 0,2 | -73,1 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 13 | -0,0356 \pm 0,0050 | -1,7 \pm 0,3 | -65,4 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 22 | -0,0260 \pm 0,0048 | -1,2 \pm 0,2 | -52,2 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 12 | -0,0269 \pm 0,0044 | -1,3 \pm 0,2 | -61,9 |

Das Gewicht des BAT wurde durch die Behandlung mit Rilutek in der kombinierten Männchen und Weibchen Gruppe sowie bei den Weibchen, einzeln betrachtet, im Vergleich zu den Placebotieren, signifikant erhöht (Tabelle 26, Männchen und Weibchen kombiniert: $p=0,0016$; Weibchen: $p=0,0143$, beide Rilutek vs. Placebo). Dieser Effekt könnte aber auch schon von der signifikant erhöhten Fettmasse zu Beginn der Überlebensstudie hervorgerufen worden sein (Tabelle 23). Alle Behandlungsgruppen bei den männlichen Tieren zeigten keine Veränderung der BAT-Masse im Vergleich zu den Placebos (Tabelle 26). Die Behandlung mit 10 mg/kg/d Propranolol, 20 mg/kg/d Oxprenolol sowie mit *R*- und *S*-Oxprenolol (je 10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d), verglichen mit der Placebogruppe, hatte keinen Einfluss auf das BAT-Gewicht in der Überlebensstudie. Tabelle 26 fasst die Gewichte des BAT in der Überlebensstudie mit allen Behandlungsgruppen zusammen.

Tabelle 26: BAT-Gewicht in der Überlebensstudie. Behandlung mit Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), Propranolol (10 mg/kg/d), Oxprenolol (20 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ vs. Placebo.

| BAT [mg] | Männchen & Weibchen | Männchen | Weibchen |
|---------------------------------|---------------------|----------|----------------|
| Anzahl der Tiere | [n] | [n] | [n] |
| Placebo | 41,2 \pm 2,4 | 33 | 45,0 \pm 4,0 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 53,7 \pm 3,0** | 27 | 54,8 \pm 3,9 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 45,1 \pm 2,9 | 29 | 48,7 \pm 5,1 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 40,6 \pm 2,8 | 27 | 45,7 \pm 3,6 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 44,5 \pm 3,4 | 25 | 46,7 \pm 5,0 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 43,2 \pm 4,1 | 24 | 54,0 \pm 6,8 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 46,8 \pm 3,5 | 26 | 53,2 \pm 5,0 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 42,7 \pm 2,3 | 25 | 46,5 \pm 3,0 |

3.2.3.3 Fettfreie Masse

In der kombinierten Männchen und Weibchen-Gruppe und auch bei den Männchen, einzeln betrachtet, wurde der Verlust der fettfreien Masse am Ende der Studie sowie der tägliche Verlust an fettfreier Masse durch die Behandlung mit 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol signifikant reduziert (Tabelle 27). Mit Rilutek behandelte Männchen verloren signifikant 5 % weniger fettfreie Masse im Vergleich zu den Placebos (Tabelle 27, $p = 0,0467$, Rilutek vs. Placebo). Außerdem führte die Behandlung der Männchen mit 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol, im Vergleich zu Placebotieren, zu einem signifikant geringeren Verlust an fettfreier Masse pro Tag (Tabelle 27). Weiblichen Tieren, denen 10 mg/kg/d Propranolol oder 10 mg/kg/d *R*-Oxprenolol verabreicht wurden, wiesen, im Vergleich zur Placebogruppe, einen signifikant erhöhten Verlust an fettfreier Masse auf (Tabelle 27, 10 mg/kg/d Propranolol: $p = 0,0120$, 10 mg/kg/d *R*-Oxprenolol: $p = 0,0223$, beide vs. Placebo).

Tabelle 27: Fettfreie Masse in der Überlebensstudie. Behandlung mit Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), Propranolol (10 mg/kg/d), Oxprenolol (20 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. Placebo.

| Δ fettfreie Masse | Tiere [n] | pro Tag [g] | am Ende [g] | am Ende [%] |
|---------------------------------|-----------|-----------------------|-----------------|-------------|
| Männchen und Weibchen | | | | |
| Placebo | 48 | -0,1359 \pm 0,0195 | -4,3 \pm 0,3 | -23,5 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 33 | -0,0923 \pm 0,0158 | -3,7 \pm 0,3 | -19,6 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 28 | -0,1070 \pm 0,0074 | -4,9 \pm 0,3 | -26,8 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 29 | -0,1020 \pm 0,0107 | -4,7 \pm 0,4 | -25,1 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 25 | -0,1258 \pm 0,0127 | -5,1 \pm 0,3 | -27,0 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 28 | -0,0966 \pm 0,0064 | -4,6 \pm 0,3 | -25,1 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 47 | -0,0896 \pm 0,0092* | -3,3 \pm 0,3* | -17,7 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 26 | -0,0933 \pm 0,0075 | -4,8 \pm 0,4 | -25,1 |

| Δ fettfreie Masse | Tiere [n] | pro Tag [g] | am Ende [g] | am Ende [%] |
|---------------------------------|-----------|-----------------|-------------|-------------|
| Männchen | | | | |
| Placebo | 21 | -0,1781±0,0320 | -5,4±0,4 | -25,2 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 15 | -0,0874±0,0211 | -4,2±0,4* | -20,1 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 15 | -0,1186±0,0106 | -5,1±0,4 | -24,5 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 14 | -0,1194±0,0177 | -5,6±0,7 | -26,7 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 14 | -0,1297±0,0099 | -5,5±0,5 | -25,9 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 15 | -0,1064±0,0085 | -5,1±0,4 | -24,6 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 25 | -0,1151±0,0139 | -3,7±0,5* | -17,9 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 15 | -0,0958±0,0106* | -5,4±0,6 | -25,1 |
| Weibchen | | | | |
| Placebo | 27 | -0,0843±0,0119 | -3,4±0,2 | -21,0 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 18 | -0,0969±0,0242 | -3,3±0,4 | -19,4 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 13 | -0,0912±0,0083 | -4,7±0,4* | -29,9 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 15 | -0,0858±0,0116 | -3,8±0,4 | -22,9 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 11 | -0,1213±0,0257 | -4,6±0,4* | -27,7 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 13 | -0,0852±0,0091 | -4,0±0,4 | -25,2 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 22 | -0,0692±0,0108 | -2,9±0,4 | -17,7 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 11 | -0,0907±0,0109 | -4,0±0,5 | -24,2 |

3.2.3.4 Muskelmasse

Bei den Männchen gab es keine signifikanten Unterschiede der GC-Muskelmasse durch die Behandlung mit Rilutek und den β -Blockern verglichen mit Placebotieren. Wohingegen die mit Rilutek- und Oxprenolol-behandelten weiblichen Tiere, im Vergleich zu Placebotieren, signifikant mehr GC-Muskelmasse besaßen (Tabelle 28, Rilutek: $p=0,0131$, Oxprenolol: $p=0,0260$, beide vs. Placebo). Das TA-Gewicht der männlichen und weiblichen Tiere wurde durch die Behandlung mit Rilutek und den β -Blockern, versus die Placebotiere, nicht beeinflusst (Tabelle 28). Das Gewicht des Soleus war in der kombinierten Männchen und Weibchen-Gruppe, die mit Oxprenolol behandelt wurden, im Vergleich zur Placebogruppe, signifikant reduziert. Des Weiteren war die Soleus-Muskelmasse in der 10 mg/kg/d *R*-Oxprenolol-Gruppe der Männchen und Weibchen ebenfalls, versus Placebos, signifikant erniedrigt (Tabelle 28). Das Gewicht des EDL wurde signifikant reduziert, wenn die Männchen und Weibchen in der kombinierten Gruppe mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol, verglichen zu den Placebos, behandelt wurden (Tabelle 28, $p=0,0099$, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol vs. Placebo). Bei den Männchen wurde durch die Behandlung mit beiden Dosen *R*-Oxprenolol ein signifikant reduziertes EDL-Gewicht, im Vergleich zur Placebogruppe, festgestellt (Tabelle 28). Die Behandlung der Weibchen mit Rilutek und den β -Blockern bewirkte keine signifikanten Änderungen der EDL-Muskelmasse im Vergleich zu Placebos. Die Behandlung der Männchen mit 10 mg/kg/d *R*-Oxprenolol erzeugte, im Vergleich zu Placebotieren, ein signifikant reduziertes Herz-Gewicht (Tabelle 28, $p=0,0392$, 10 mg/kg/d *R*-Oxprenolol vs. Placebo). Die Herz-Muskelmasse der Weibchen war durch

die Behandlung mit Rilutek, 10 mg/kg/d Propranolol sowie 10 mg/kg/d *R*-Oxprenolol, versus die Placebos, signifikant erhöht (Tabelle 28).

Tabelle 28: Muskelgewichte in der Überlebensstudie. Behandlung mit Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), Propranolol (10 mg/kg/d), Oxprenolol (20 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. Placebo. GC=*Musculus gastrocnemius*, TA= *Musculus tibialis anterior*, EDL= *Musculus extensor digitorum longus*.

| GC [mg] | Männ. & Weib. | Männchen | Weibchen |
|---------------------------------|--------------------------|-----------------|------------------|
| Anzahl der Tiere | [n] | [n] | [n] |
| Placebo | 47,7 \pm 3,0 | 32 | 57,2 \pm 5,3 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 55,2 \pm 3,0 | 29 | 56,3 \pm 4,9 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 52,4 \pm 3,3 | 29 | 63,3 \pm 3,7 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 52,2 \pm 2,3 | 27 | 54,7 \pm 3,9 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 50,8 \pm 3,3 | 25 | 53,8 \pm 5,1 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 47,0 \pm 2,6 | 28 | 50,0 \pm 3,0 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 55,1 \pm 4,0 | 26 | 59,1 \pm 6,6 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 50,2 \pm 3,0 | 26 | 53,1 \pm 4,3 |
| 41,2 \pm 2,9 | 19 | 41,2 \pm 2,9 | 19 |
| 54,1 \pm 3,7* | 15 | 54,1 \pm 3,7* | 15 |
| 40,6 \pm 3,3 | 14 | 40,6 \pm 3,3 | 14 |
| 49,5 \pm 2,1* | 13 | 49,5 \pm 2,1* | 13 |
| 47,5 \pm 4,1 | 12 | 47,5 \pm 4,1 | 12 |
| 43,6 \pm 4,2 | 13 | 43,6 \pm 4,2 | 13 |
| 50,5 \pm 4,0 | 12 | 50,5 \pm 4,0 | 12 |
| 46,2 \pm 3,9 | 11 | 46,2 \pm 3,9 | 11 |
| TA [mg] | Männ. & Weib. | Männchen | Weibchen |
| Anzahl der Tiere | [n] | [n] | [n] |
| Placebo | 21,5 \pm 1,1 | 35 | 26,5 \pm 2,1 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 22,9 \pm 1,1 | 22 | 24,3 \pm 1,8 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 21,0 \pm 1,5 | 19 | 24,9 \pm 1,9 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 22,4 \pm 1,2 | 21 | 24,3 \pm 1,7 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 21,0 \pm 1,3 | 19 | 23,3 \pm 1,4 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 20,4 \pm 1,3 | 23 | 22,6 \pm 1,8 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 24,1 \pm 1,7 | 20 | 27,2 \pm 2,2 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 22,1 \pm 1,2 | 22 | 23,4 \pm 1,8 |
| 19,8 \pm 1,1 | 26 | 19,8 \pm 1,1 | 26 |
| 21,5 \pm 1,4 | 11 | 21,5 \pm 1,4 | 11 |
| 17,4 \pm 1,7 | 10 | 17,4 \pm 1,7 | 10 |
| 19,3 \pm 1,0 | 8 | 19,3 \pm 1,0 | 8 |
| 17,8 \pm 1,9 | 8 | 17,8 \pm 1,9 | 8 |
| 18,8 \pm 1,8 | 13 | 18,8 \pm 1,8 | 13 |
| 19,5 \pm 2,1 | 8 | 19,5 \pm 2,1 | 8 |
| 20,5 \pm 1,3 | 10 | 20,5 \pm 1,3 | 10 |
| Soleus [mg] | Männ. & Weib. | Männchen | Weibchen |
| Anzahl der Tiere | [n] | [n] | [n] |
| Placebo | 5,8 \pm 0,2 | 32 | 6,0 \pm 0,3 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 5,5 \pm 0,4 | 30 | 5,7 \pm 0,6 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 5,6 \pm 0,3 | 29 | 5,6 \pm 0,4 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 5,0 \pm 0,4* | 27 | 5,2 \pm 0,5 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 4,5 \pm 0,4** | 25 | 4,7 \pm 0,5* |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 5,5 \pm 0,3 | 28 | 5,8 \pm 0,4 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 5,9 \pm 0,4 | 26 | 6,0 \pm 0,5 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 6,4 \pm 0,4 | 22 | 6,6 \pm 0,6 |
| 5,7 \pm 0,3 | 19 | 5,7 \pm 0,3 | 19 |
| 5,3 \pm 0,5 | 16 | 5,3 \pm 0,5 | 16 |
| 5,6 \pm 0,4 | 14 | 5,6 \pm 0,4 | 14 |
| 4,8 \pm 0,5 | 13 | 4,8 \pm 0,5 | 13 |
| 4,2 \pm 0,5* | 12 | 4,2 \pm 0,5* | 12 |
| 5,1 \pm 0,5 | 13 | 5,1 \pm 0,5 | 13 |
| 5,7 \pm 0,5 | 12 | 5,7 \pm 0,5 | 12 |
| 6,2 \pm 0,3 | 8 | 6,2 \pm 0,3 | 8 |
| EDL [mg] | Männ. & Weib. | Männchen | Weibchen |
| Anzahl der Tiere | [n] | [n] | [n] |
| Placebo | 6,9 \pm 0,2 | 33 | 7,8 \pm 0,3 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 6,7 \pm 0,3 | 30 | 7,2 \pm 0,5 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 7,1 \pm 0,4 | 29 | 7,9 \pm 0,5 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 7,2 \pm 0,4 | 27 | 7,5 \pm 0,7 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 6,5 \pm 0,5 | 27 | 6,6 \pm 0,6* |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 5,9 \pm 0,3** | 28 | 5,8 \pm 0,4** |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 7,2 \pm 0,3 | 29 | 7,3 \pm 0,5 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 7,8 \pm 0,3 | 26 | 8,1 \pm 0,4 |
| 6,3 \pm 0,3 | 19 | 6,3 \pm 0,3 | 19 |
| 6,3 \pm 0,4 | 16 | 6,3 \pm 0,4 | 16 |
| 6,2 \pm 0,4 | 14 | 6,2 \pm 0,4 | 14 |
| 7,0 \pm 0,4 | 13 | 7,0 \pm 0,4 | 13 |
| 6,5 \pm 0,7 | 12 | 6,5 \pm 0,7 | 12 |
| 6,0 \pm 0,5 | 13 | 6,0 \pm 0,5 | 13 |
| 7,0 \pm 0,5 | 12 | 7,0 \pm 0,5 | 12 |
| 7,3 \pm 0,4 | 11 | 7,3 \pm 0,4 | 11 |
| Herz [mg] | Männ. & Weib. | Männchen | Weibchen |
| Anzahl der Tiere | [n] | [n] | [n] |
| Placebo | 100,5 \pm 3,4 | 31 | 117,9 \pm 3,4 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 103,5 \pm 2,8 | 28 | 115,6 \pm 2,4 |
| 10 mg/kg/d Propranolol | 104,0 \pm 3,2 | 29 | 113,5 \pm 4,6 |
| 20 mg/kg/d Oxprenolol | 100,2 \pm 2,8 | 27 | 110,2 \pm 3,0 |
| 10 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 101,2 \pm 2,7 | 25 | 107,4 \pm 3,4* |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 100,7 \pm 3,9 | 25 | 112,0 \pm 4,1 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 108,6 \pm 5,7 | 26 | 122,6 \pm 8,8 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 104,1 \pm 3,5 | 26 | 112,4 \pm 4,6 |
| 86,1 \pm 1,5 | 18 | 86,1 \pm 1,5 | 18 |
| 91,4 \pm 2,3* | 14 | 91,4 \pm 2,3* | 14 |
| 93,8 \pm 2,7* | 14 | 93,8 \pm 2,7* | 14 |
| 89,5 \pm 2,4 | 13 | 89,5 \pm 2,4 | 13 |
| 94,4 \pm 3,4* | 12 | 94,4 \pm 3,4* | 12 |
| 88,5 \pm 4,6 | 12 | 88,5 \pm 4,6 | 12 |
| 92,3 \pm 3,2 | 12 | 92,3 \pm 3,2 | 12 |
| 92,8 \pm 3,0 | 11 | 92,8 \pm 3,0 | 11 |

3.3 Vergleichsstudie - Behandlungseffekt 41 Tage nach Erstsymptomatik

Aufgrund der Ergebnisse aus Abschnitt 3.2 wurden 20 mg/kg/d Oxprenolol, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und beide Dosen *S*-Oxprenolol (10 und 20 mg/kg/d) für die Experimente in der Vergleichsstudie verwendet. Als Referenzgruppen wurden außerdem eine WT-Gruppe, Placebos und eine 30 mg/kg/d Rilutek-behandelte Gruppe für die Vergleichsstudie ausgewählt. Die Tiere wurden für eine Dauer von 41 Tage (~120 Tage nach Geburt) nach Erstsymptomatik mit besagten Gruppen behandelt und anschließend euthanasiert. Im Fokus standen Untersuchungen zu phänotypischen Merkmalen (Körpergewicht, Körperzusammensetzung) sowie Analysen im primären Motorcortex und im lumbalen Rückenmark (Motoneuronenanzahl, Gliazellen) und zur Muskelatrophie (Regulation des Kata- und Anabolismus).

3.3.1 Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Muskelgewichte

Zu Beginn der Vergleichsstudie (Basis) wiesen die Tiere ein gleiches Körpergewicht, eine gleiche Fett- sowie fettfreie Masse auf (Tabelle 29).

Tabelle 29: Körpergewicht, Fettmasse und fettfreie Masse zu Beginn der Vergleichsstudie (Basis). Angaben als Mittelwert \pm SEM.

| Behandlung | Tiere [n] | Basis-Körpergewicht [g] | Basis-Fett [g] | Basis-fettfreie Masse [g] |
|---------------------------------|-----------|-------------------------|----------------|---------------------------|
| Männchen und Weibchen | | | | |
| WT | 57 | 23,8 \pm 0,5 | 2,3 \pm 0,1 | 18,9 \pm 0,4 |
| Placebo | 27 | 23,2 \pm 0,6 | 2,3 \pm 0,1 | 18,5 \pm 0,5 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 27 | 22,4 \pm 0,5 | 2,4 \pm 0,2 | 17,9 \pm 0,4 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 29 | 23,4 \pm 0,7 | 2,2 \pm 0,1 | 18,9 \pm 0,6 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 16 | 23,3 \pm 0,9 | 2,1 \pm 0,2 | 18,9 \pm 0,9 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 26 | 23,9 \pm 0,6 | 2,9 \pm 0,2 | 18,9 \pm 0,5 |
| Männchen | | | | |
| WT | 28 | 27,2 \pm 0,4 | 2,5 \pm 0,1 | 21,6 \pm 0,3 |
| Placebo | 14 | 25,7 \pm 0,4 | 2,1 \pm 0,1 | 20,9 \pm 0,2 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 13 | 24,4 \pm 0,6 | 2,2 \pm 0,2 | 19,6 \pm 0,4 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 14 | 26,8 \pm 0,6 | 2,2 \pm 0,2 | 21,7 \pm 0,5 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 7 | 27,0 \pm 0,8 | 1,9 \pm 0,1 | 22,2 \pm 0,9 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 12 | 26,6 \pm 0,7 | 2,8 \pm 0,3 | 21,2 \pm 0,4 |
| Weibchen | | | | |
| WT | 29 | 20,4 \pm 0,2 | 2,0 \pm 0,1 | 16,3 \pm 0,2 |
| Placebo | 13 | 20,4 \pm 0,5 | 2,6 \pm 0,2 | 15,9 \pm 0,4 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 14 | 20,6 \pm 0,5 | 2,7 \pm 0,3 | 16,3 \pm 0,3 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 15 | 20,1 \pm 0,4 | 2,3 \pm 0,2 | 16,2 \pm 0,3 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 9 | 20,4 \pm 0,5 | 2,2 \pm 0,3 | 16,3 \pm 0,4 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 14 | 21,6 \pm 0,4 | 3,2 \pm 0,3 | 17,0 \pm 0,2 |

3.3.1.1 Körpergewicht

Männliche und weibliche WT-Tiere, einzeln sowie kombiniert betrachtet, nahmen, im Vergleich zu Placebotieren, signifikant an Gewicht zu (Abbildung 21, $p < 0,0001$, WT vs.

Placebo). In der kombinierten Gruppe der Männchen und Weibchen, die mit 10 mg/kg/d S-Oxprenolol behandelt wurden, verloren die Tiere verglichen mit den Placebos signifikant 8 % weniger Körpergewicht (Abbildung 21A, $p=0,0406$ 10 mg/kg/d S-Oxprenolol vs. Placebo). Die Behandlung mit 30 mg/kg/d Rilutek als auch mit 20 mg/kg/d R-Oxprenolol sowie mit beiden Dosen S-Oxprenolol (10 oder 20 mg/kg/d) zeigte, versus den Placebotieren, keinen signifikanten Einfluss auf die Änderung des Körpergewichtes bis zum Ende der Studie bei den männlichen ALS-Tieren (Abbildung 21B). Rilutek und 20 mg/kg/d R-Oxprenolol zeigten ebenfalls im Vergleich zu Placebos bei den Weibchen keine signifikanten Unterschiede auf die Änderung des Körpergewichtes. Allerdings nahmen weibliche Tiere, die sowohl mit der niedrigeren als auch mit der höheren Dosis S-Oxprenolol behandelt wurden, signifikant 0,9 % Körpergewicht, im Vergleich zur Placebogruppe, zu (Abbildung 21C, 10 mg/kg/d S-Oxprenolol: $p=0,0252$, 20 mg/kg/d S-Oxprenolol: $p=0,0152$, beide vs. Placebo).

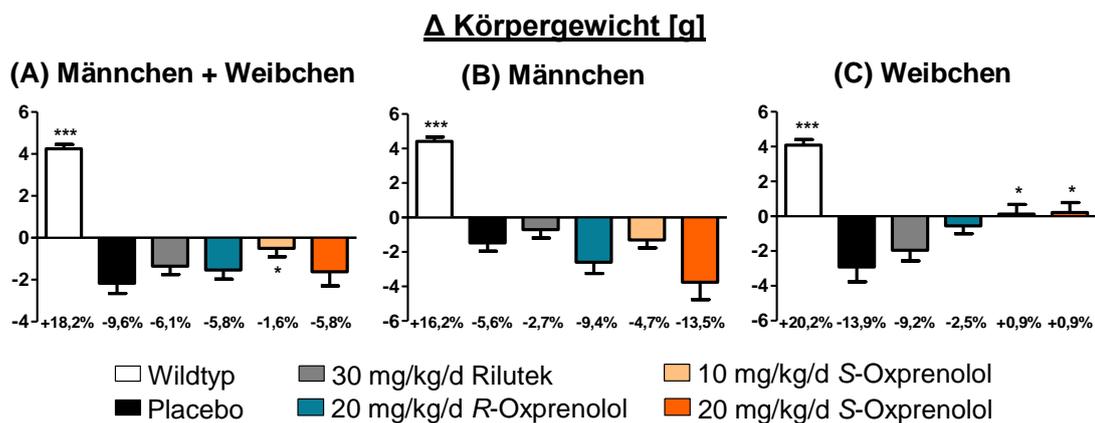


Abbildung 21: Veränderung (Δ) des Körpergewichtes [g] in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), R-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und S-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). (A) Männchen und Weibchen, (B) Männchen und (C) Weibchen. Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p<0,05$, ***: $p<0,001$ vs. Placebo.

3.3.1.2 Fettmasse

Die WT-Tiere nahmen, im Vergleich zu den Placebos, signifikant an Fettmasse zu (Abbildung 22, Männchen und Weibchen kombiniert: $p<0,0001$, Männchen einzeln: $p=0,0210$, Weibchen einzeln: $p=0,0003$, alle vs. Placebo). Männchen, die 20 mg/kg/d S-Oxprenolol bekamen, verloren signifikant mehr Fettmasse als die Placebogruppe (Abbildung 22B, $p=0,0109$, 20 mg/kg/d S-Oxprenolol vs. Placebo). Wohingegen die mit 20 mg/kg/d R-Oxprenolol- und 20 mg/kg/d S-Oxprenolol-behandelten weiblichen ALS-Tiere signifikant weniger Fett, im Vergleich zu den Placebos, verloren (Abbildung 22C, 20 mg/kg/d R-Oxprenolol: $p=0,0304$, 20 mg/kg/d S-Oxprenolol: $p=0,0308$, beide vs. Placebo).

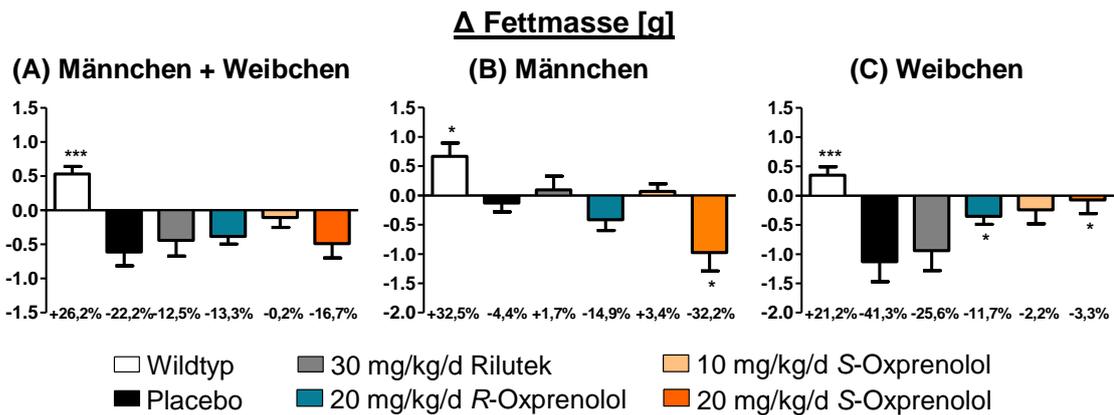


Abbildung 22: Veränderung (Δ) der Fettmasse [g] in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), R-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und S-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d) wobei (A) Δ Fett [g] Männchen und Weibchen, (B) Δ Fett Männchen und (C) Δ Fett Weibchen. Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ vs. Placebo.

Die Behandlung der ALS-Tiere mit 20 mg/kg/d R-Oxprenolol, versus die Placebogruppe, führte zu einer Reduktion des BAT (Abbildung 23). Wobei die kombinierte Gruppe an Männchen und Weibchen und auch die Männchen, einzeln betrachtet, signifikant mehr BAT-Masse, im Vergleich zu den Placebotieren, verloren (Abbildung 23A, Männchen und Weibchen: $p = 0,0198$, Abbildung 23B, Männchen einzeln: $p = 0,0152$, beide vs. Placebo). Bei den Weibchen führte, im Vergleich zur Placebogruppe, keine der Behandlungen zu einem signifikanten Unterschied der BAT-Masse (Abbildung 23).

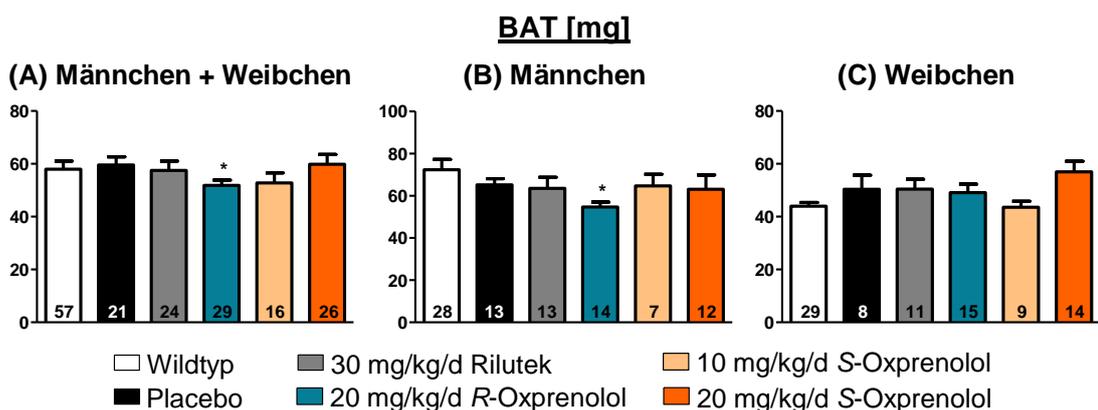


Abbildung 23: BAT-Gewicht in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), R-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und S-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. Placebo. Anzahl der Tiere im Diagrammbalken angegeben.

3.3.1.3 Fettfreie Masse

Die WT-Referenzgruppe nahm, verglichen mit den Placebos, signifikant an fettfreier Masse zu (Abbildung 24, Tabelle 33, $p < 0,0001$, WT vs. Placebo). Durch die Behandlung mit 10 mg/kg/d S-Oxprenolol verloren die Tiere aus der kombinierten

Gruppe an Männchen und Weibchen, im Vergleich zu den Placebotieren, signifikant weniger fettfreie Masse (Abbildung 24A, $p=0,0188$, 10 mg/kg/d S-Oxprenolol vs. Placebo). Die Behandlung der Männchen mit Rilutek und *R*- sowie S-Oxprenolol bewirkte, verglichen mit Placebotieren, keine signifikante Änderung der fettfreien Masse (Abbildung 24B). Allerdings verloren die Weibchen durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und beiden Dosen S-Oxprenolol, verglichen mit den Placebos, signifikant weniger fettfreie Masse (Abbildung 24C; 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol: $p=0,0427$, 10 mg/kg/d S-Oxprenolol: $p=0,0062$, 20 mg/kg/d S-Oxprenolol: $p=0,0082$, alle vs. Placebo).

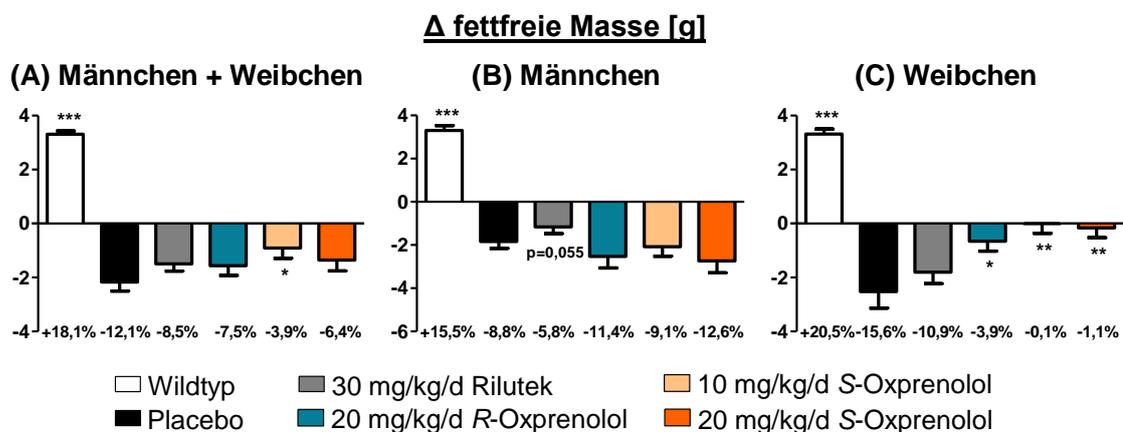


Abbildung 24: Veränderung (Δ) der fettfreien Masse [g] in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und S-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). (A) Männchen und Weibchen, (B) Männchen und (C) Weibchen. Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p<0,05$ vs. Placebo, **: $p<0,01$ vs. Placebo, ***: $p<0,001$ vs. Placebo.

3.3.1.4 Muskelmasse

Das Gewicht der Skelettmuskeln (GC, TA, Soleus und EDL) sowie des Herzens erhöhte sich bei den WT-Tieren, im Vergleich zur Placebogruppe, signifikant (Tabelle 30). Die Behandlung mit 30 mg/kg/d Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol sowie mit 10 mg/kg/d bzw. 20 mg/kg/d S-Oxprenolol, verglichen mit den Placebos, führte zu keiner signifikanten Änderung der Skelettmuskelmasse sowie der Herzmasse in der kombinierten Männchen und Weibchen-Gruppe oder bei den Männchen, einzeln betrachtet (Tabelle 30). Durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d S-Oxprenolol verloren die Weibchen, im Vergleich zur Placebogruppe, signifikant weniger GC-Masse (Tabelle 30, $p=0,0402$, 20 mg/kg/d S-Oxprenolol vs. Placebo). Weibliche Tiere, die mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol oder mit 20 mg/kg/d S-Oxprenolol behandelt wurden, besaßen signifikant mehr TA-Masse als Placebotiere (Tabelle 30, *R*-Oxprenolol: $p=0,0445$, 20 mg/kg/d S-Oxprenolol: $p=0,0156$, beide vs. Placebo). Die Behandlung der Weibchen mit Rilutek sowie *R*- und S-Oxprenolol führte, im Vergleich zu den Placebos, zu keiner signifikanten Änderung der Soleus-, EDL- und Herzmasse (Tabelle 30).

Tabelle 30: Muskelgewichte [mg] in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), R-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und S-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. Placebo, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. Placebo. GC= *Musculus Gastrocnemius*, TA= *Musculus Tibialis anterior*, EDL= *Musculus Extensor Digitorum Longus*.

| GC [mg] | Männchen & Weibchen | | Männchen | | Weibchen | |
|-------------------------|--------------------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|
| Anzahl der Tiere | [n] | | [n] | | [n] | |
| WT | 148,8 \pm 3,2*** | 57 | 170,0 \pm 2,7*** | 28 | 128,4 \pm 1,6*** | 29 |
| Placebo | 60,5 \pm 3,6 | 18 | 67,8 \pm 3,4 | 11 | 49,0 \pm 5,1 | 7 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 57,8 \pm 3,6 | 24 | 64,2 \pm 5,1 | 13 | 50,2 \pm 4,2 | 11 |
| 20 mg/kg/d R-Oxprenolol | 71,3 \pm 3,6 | 28 | 72,8 \pm 5,8 | 14 | 67,4 \pm 4,5 | 14 |
| 10 mg/kg/d S-Oxprenolol | 62,1 \pm 4,4 | 16 | 68,2 \pm 5,9 | 7 | 57,3 \pm 6,1 | 9 |
| 20 mg/kg/d S-Oxprenolol | 70,6 \pm 3,3 | 25 | 70,4 \pm 3,3 | 11 | 69,3 \pm 5,4* | 14 |
| Tibialis [mg] | Männchen & Weibchen | | Männchen | | Weibchen | |
| Anzahl der Tiere | [n] | | [n] | | [n] | |
| WT | 51,1 \pm 1,0*** | 57 | 57,3 \pm 1,0*** | 28 | 45,2 \pm 0,6*** | 29 |
| Placebo | 27,4 \pm 1,6 | 19 | 31,5 \pm 1,4 | 12 | 20,5 \pm 1,7 | 7 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 26,2 \pm 1,5 | 24 | 29,0 \pm 2,3 | 13 | 23,0 \pm 1,4 | 11 |
| 20 mg/kg/d R-Oxprenolol | 28,7 \pm 1,3 | 29 | 30,8 \pm 2,1 | 14 | 26,9 \pm 1,6* | 15 |
| 10 mg/kg/d S-Oxprenolol | 29,6 \pm 2,0 | 16 | 32,1 \pm 2,8 | 7 | 27,6 \pm 2,8 | 9 |
| 20 mg/kg/d S-Oxprenolol | 28,9 \pm 1,2 | 25 | 29,1 \pm 1,6 | 12 | 28,6 \pm 1,9* | 13 |
| Soleus [mg] | Männchen & Weibchen | | Männchen | | Weibchen | |
| Anzahl der Tiere | [n] | | [n] | | [n] | |
| WT | 8,91 \pm 0,16*** | 57 | 9,53 \pm 0,23*** | 28 | 8,31 \pm 0,19* | 29 |
| Placebo | 7,08 \pm 0,36 | 19 | 7,33 \pm 0,45 | 12 | 6,66 \pm 0,60 | 7 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 6,77 \pm 0,28 | 24 | 6,87 \pm 0,31 | 13 | 6,66 \pm 0,50 | 11 |
| 20 mg/kg/d R-Oxprenolol | 7,21 \pm 0,32 | 29 | 8,20 \pm 0,39 | 14 | 6,29 \pm 0,37 | 15 |
| 10 mg/kg/d S-Oxprenolol | 7,52 \pm 0,42 | 16 | 8,94 \pm 0,56 | 7 | 6,41 \pm 0,20 | 9 |
| 20 mg/kg/d S-Oxprenolol | 7,33 \pm 0,32 | 25 | 7,32 \pm 0,34 | 11 | 7,34 \pm 0,52 | 14 |
| EDL [mg] | Männchen & Weibchen | | Männchen | | Weibchen | |
| Anzahl der Tiere | [n] | | [n] | | [n] | |
| WT | 10,6 \pm 0,27*** | 57 | 12,3 \pm 0,25*** | 28 | 9,06 \pm 0,20** | 29 |
| Placebo | 7,95 \pm 0,35 | 20 | 8,46 \pm 0,37 | 12 | 7,19 \pm 0,62 | 8 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 8,20 \pm 0,46 | 24 | 9,05 \pm 0,56 | 13 | 7,19 \pm 0,64 | 11 |
| 20 mg/kg/d R-Oxprenolol | 8,35 \pm 0,47 | 29 | 9,51 \pm 0,76 | 14 | 7,27 \pm 0,42 | 15 |
| 10 mg/kg/d S-Oxprenolol | 8,26 \pm 0,59 | 16 | 9,77 \pm 0,84 | 7 | 7,09 \pm 0,61 | 9 |
| 20 mg/kg/d S-Oxprenolol | 7,73 \pm 0,31 | 26 | 7,88 \pm 0,41 | 12 | 7,60 \pm 0,46 | 14 |
| Herz [mg] | Männchen & Weibchen | | Männchen | | Weibchen | |
| Anzahl der Tiere | [n] | | [n] | | [n] | |
| WT | 132,2 \pm 2,5** | 57 | 147,7 \pm 2,5*** | 28 | 117,3 \pm 1,5*** | 29 |
| Placebo | 114,4 \pm 3,5 | 19 | 123,8 \pm 1,6 | 12 | 98,1 \pm 4,5 | 7 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 110,0 \pm 3,4 | 23 | 121,1 \pm 2,9 | 13 | 95,4 \pm 2,9 | 10 |
| 20 mg/kg/d R-Oxprenolol | 111,9 \pm 3,2 | 29 | 124,9 \pm 3,9 | 14 | 99,8 \pm 2,0 | 15 |
| 10 mg/kg/d S-Oxprenolol | 116,6 \pm 3,7 | 16 | 129,1 \pm 3,7 | 7 | 107,0 \pm 3,4 | 9 |
| 20 mg/kg/d S-Oxprenolol | 117,7 \pm 3,3 | 25 | 125,0 \pm 4,6 | 11 | 112,0 \pm 4,1 | 14 |

3.3.2 Motoneuronenanzahl

Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Untersuchung der Motoneuronenanzahl im primären Motorcortex und im lumbalen Rückenmark.

3.3.2.1 Anzahl von Motoneuronen im primären Motorcortex

Die Anzahl der Motoneuronen im primären Motorcortex war bei den männlichen und weiblichen WT-Tieren, im Vergleich zu den kranken Placebotieren, signifikant erhöht (Abbildung 25). Die Behandlung mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol sowie mit der höheren Dosis *S*-Oxprenolol (20 mg/kg/d) führte, versus den Placebos, zu keinem signifikanten Unterschied (Abbildung 25B). Jedoch waren durch die Behandlung der Männchen mit 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol signifikant mehr Motoneuronen als bei den Placebotieren im primären Motorcortex vorhanden (Abbildung 25B, $p=0,0109$, 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol vs. Placebo). Bei den Weibchen ergab sich, im Vergleich zur Placebogruppe, eine signifikant höhere Anzahl an Motoneuronen durch die Behandlung mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol sowie beiden Dosen *S*-Oxprenolol (Abbildung 25C). Die männlichen und weiblichen Versuchstiere, zusammen betrachtet, besaßen, verglichen mit Placebotieren, eine signifikant höhere Motoneuronenanzahl durch die Behandlung mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol als auch *S*-Oxprenolol (10 oder 20 mg/kg/d) (Abbildung 25A).

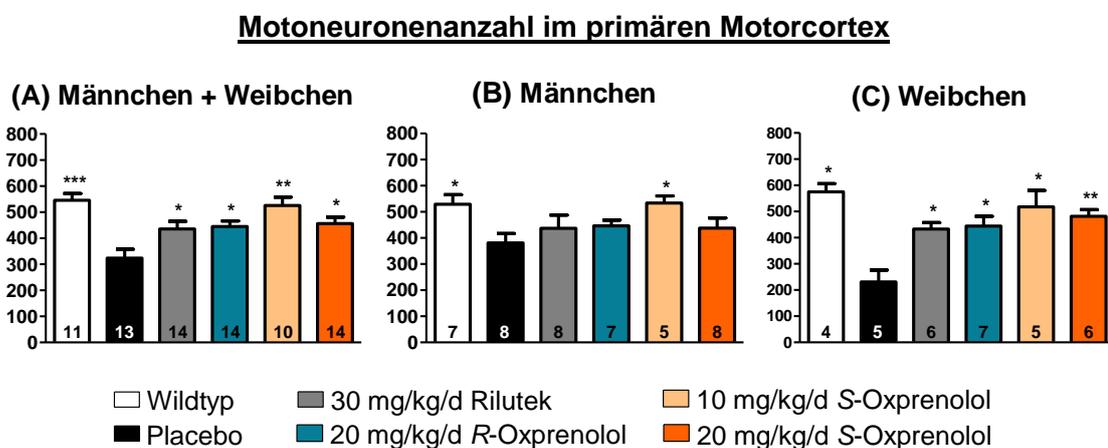


Abbildung 25: Anzahl von Motoneuronen im primären Motorcortex in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$ vs. Placebo. Anzahl der Tiere im Diagrammbalken angegeben.

Abbildung 26 zeigt repräsentative Bilder der α -ChAT-Färbung zur Ermittlung der Motoneuronenanzahl im primären Motorcortex von WT-Tieren, Placebotieren sowie mit Rilutek-, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol-, 10 mg/kg/d und 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol-behandelte Tiere.

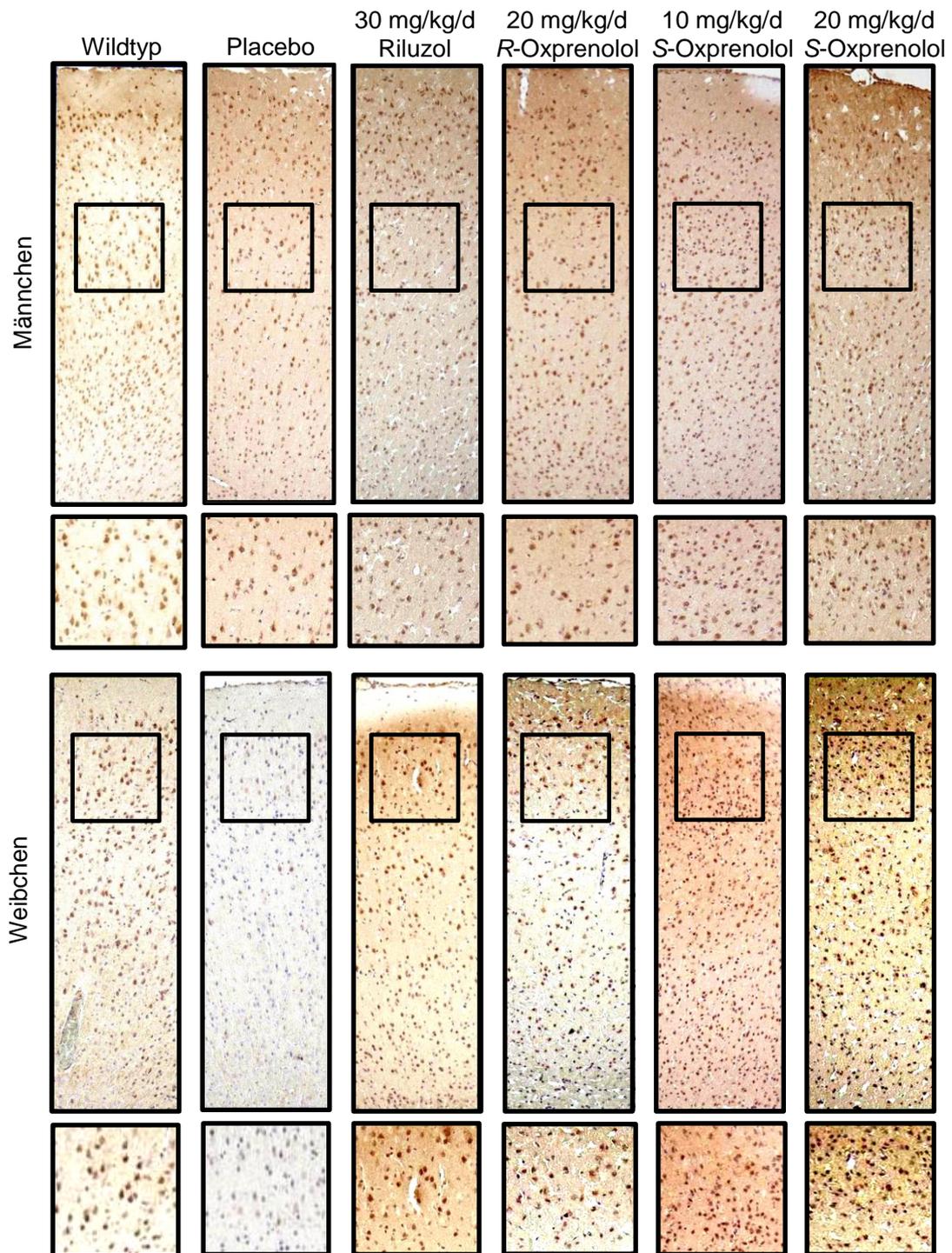


Abbildung 26: α -ChAT-Färbung vom primären Motorcortex in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). braun= α -ChAT, blau= Hämatoxylin

3.3.2.2 Anzahl von Motoneuronen im lumbalen Rückenmark

Weibliche und männliche WT-Tiere wiesen, im Vergleich zu Placebotieren, signifikant mehr Motoneuronen im lumbalen Rückenmark auf (Abbildung 27). Durch die Behandlung der Männchen und auch Weibchen mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und beiden Dosen *S*-Oxprenolol (10 oder 20 mg/kg/d) war die Motoneuronenanzahl im lumbalen Rückenmark, verglichen mit Placebotieren, signifikant erhöht (Abbildung 27).

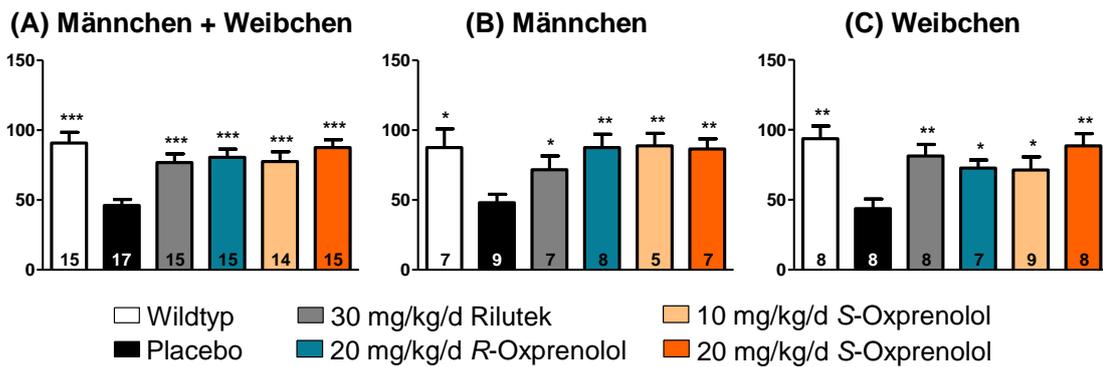
Motoneuronenanzahl im lumbalen Rückenmark

Abbildung 27: Anzahl von Motoneuronen im lumbalen Rückenmark in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), R-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und S-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. Placebo. Anzahl der Tiere im Diagrammbalken angegeben.

In Abbildung 28 werden repräsentative Bilder der α -ChAT-Färbung im Vorderhorn und Hinterhorn des lumbalen Rückenmarks von WT-Tieren, Placebos und mit Rilutek-, 20 mg/kg/d R-Oxprenolol- sowie 10 und 20 mg/kg/d S-Oxprenolol-behandelten Versuchstiere gezeigt.

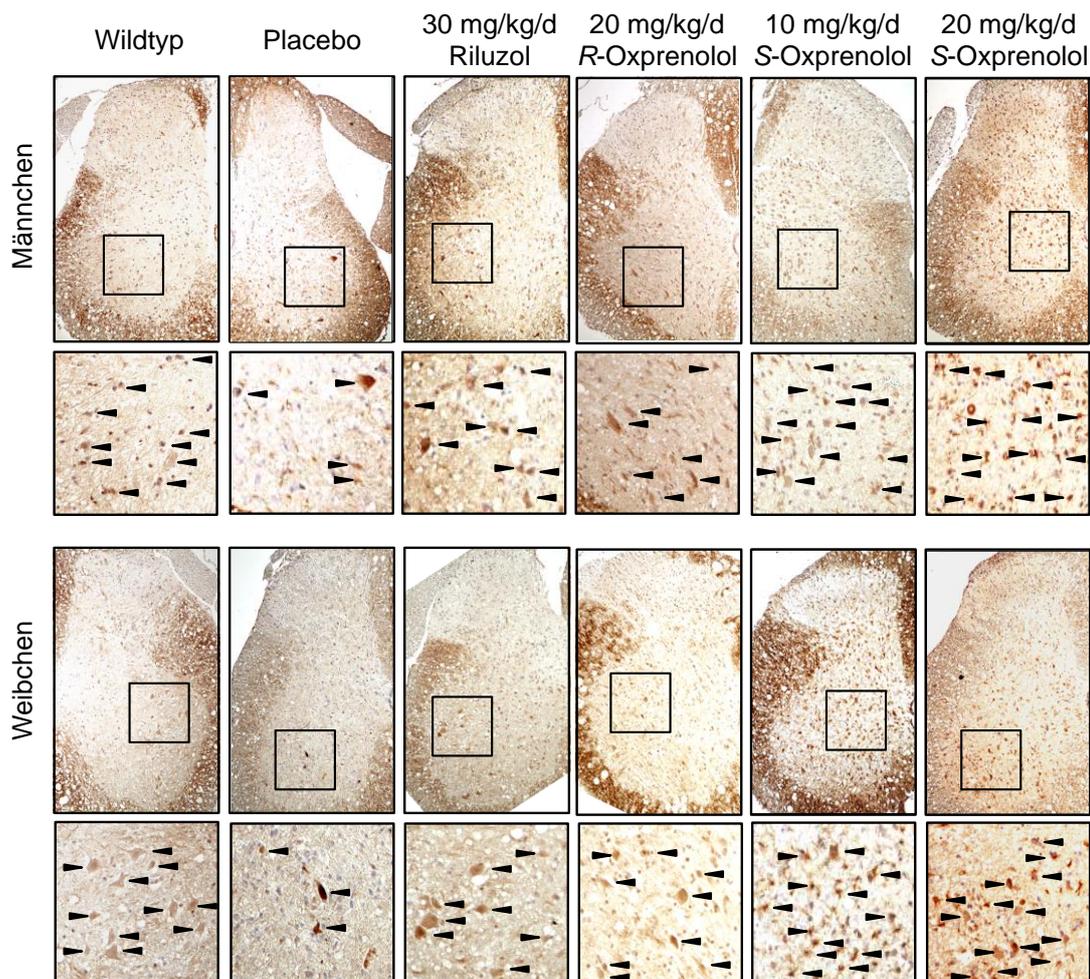


Abbildung 28: α -ChAT-Färbung vom lumbalen Rückenmark in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), R-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und S-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Pfeile zeigen beispielhaft ChAT-positive Motoneurone (braun), blau= Hämatoxylin.

3.3.3 Inflammation

Astrozyten (Makroglia) und Mikroglia setzen Zytokine frei. Im folgenden Abschnitt wurde die Anzahl der Astrozyten und Mikrogliazellen mit Hilfe spezifischer Färbungen im lumbalen Rückenmark ermittelt. Anschließend wurde eine Analyse verschiedener Zytokine im Blutplasma von WT-Tieren, Placebos sowie mit Rilutek-, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol- und 10 bzw. 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol-behandelte ALS-Tiere vorgenommen.

3.3.3.1 Astrozyten im lumbalen Rückenmark

Die Anzahl der Astrozyten in der grauen und weißen Substanz des lumbalen Rückenmarks der gesunden männlichen und weiblichen WT-Tiere war, im Vergleich zur kranken Placebogruppe, signifikant reduziert (Abbildung 29). Die Behandlung der Männchen mit Rilutek und den β -Blockern ergab keine signifikanten Unterschiede zu den Placebotieren (Abbildung 29B). Jedoch führte die Behandlung der Weibchen mit Rilutek als auch mit beiden Dosen *S*-Oxprenolol (10 und 20 mg/kg/d), im Vergleich zu Placebos, zu einer signifikanten Reduktion der Astrozytenanzahl (Abbildung 29C). Betrachtet man die Männchen und Weibchen kombiniert, so war die Anzahl der Astrozyten durch die Behandlung mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und der niedrigeren Dosis *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d), verglichen mit der Placebogruppe, signifikant gesenkt (Abbildung 29A).

Astrozytenanzahl im lumbalen Rückenmark

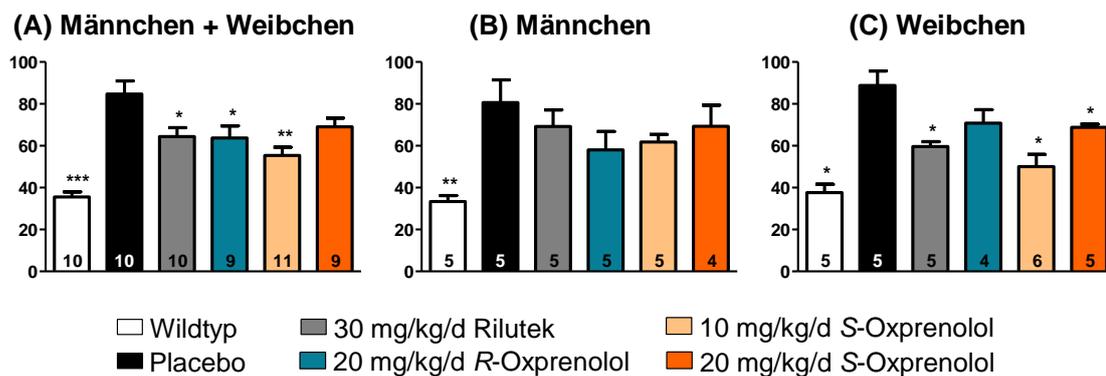


Abbildung 29: Anzahl von Astrozyten im lumbalen Rückenmark in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. Placebo. Anzahl der Tiere im Diagrammbalken angegeben.

Abbildung 30 zeigt die repräsentative α -GFAP-Färbung zur Ermittlung der Astrozyten in der grauen und weißen Substanz des lumbalen Rückenmarks von WT- und Placebotieren sowie mit Rilutek-, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol- und 10 bzw. 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol-behandelten Versuchstieren.

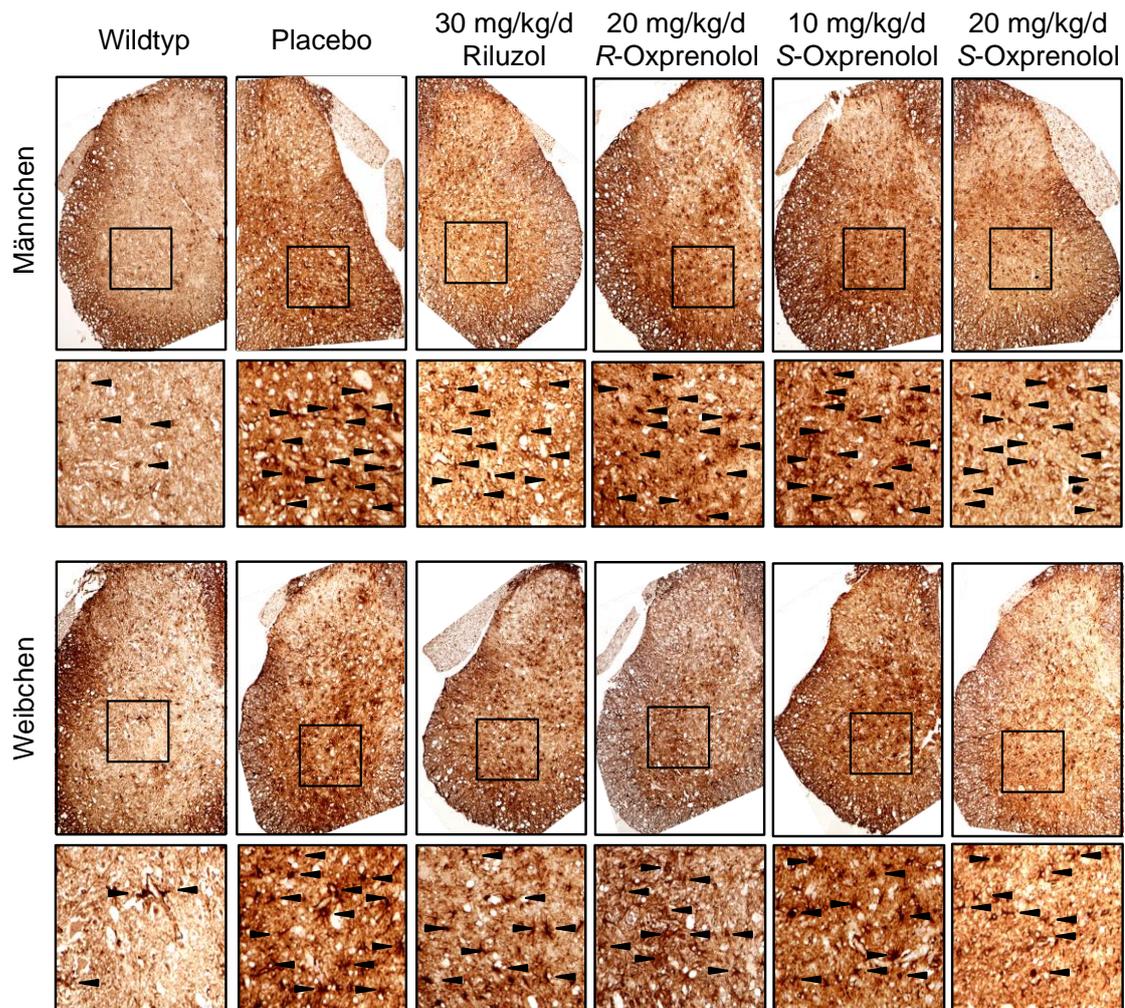


Abbildung 30: α -GFAP-Färbung vom lumbalen Rückenmark in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Pfeile zeigen beispielhaft GFAP-positive Astrozyten. braun= α -GFAP

3.3.3.2 Mikrogliazellen im lumbalen Rückenmark

Die Mikrogliaanzahl in der grauen und weißen Substanz des lumbalen Rückenmarks war bei den männlichen und weiblichen WT-Tieren, im Vergleich zu Placebotieren, signifikant reduziert (Abbildung 31). Die Behandlung der Männchen und Weibchen mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und beiden Dosen *S*-oxprenolol (10 bzw. 20 mg/kg/d) führte, verglichen mit Placebotieren, zu keiner signifikanten Änderung der Anzahl an Mikrogliazellen im lumbalen Rückenmark (Abbildung 31B, Abbildung 31C). Allerdings war die Mikrogliaanzahl, bei den Männchen und Weibchen kombiniert betrachtet, durch die Behandlung mit der niedrigeren Dosis *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d), im Vergleich zu den Placebotieren, signifikant reduziert (Abbildung 31A).

Mikrogliaanzahl im lumbalen Rückenmark

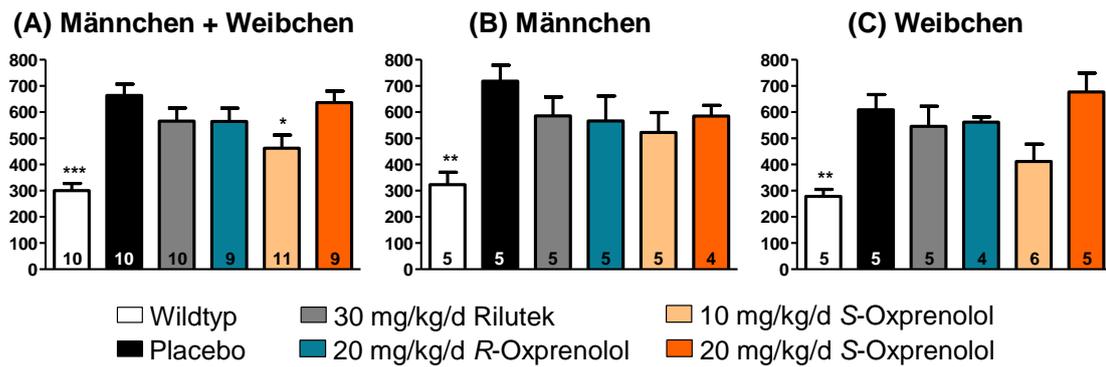


Abbildung 31: Anzahl von Mikrogliazellen im lumbalen Rückenmark in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), R-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und S-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. Placebo, **: $p < 0,01$ vs. Placebo, ***: $p < 0,001$ vs. Placebo. Anzahl der Tiere im Diagrammbalken angegeben.

Abbildung 32 zeigt repräsentative RCA-1-gefärbte Bilder des lumbalen Rückenmarks von WT- und Placebotieren sowie mit Rilutek-, 20 mg/kg/d R-Oxprenolol- und 10 bzw. 20 mg/kg/d S-Oxprenolol-behandelten Versuchstieren.

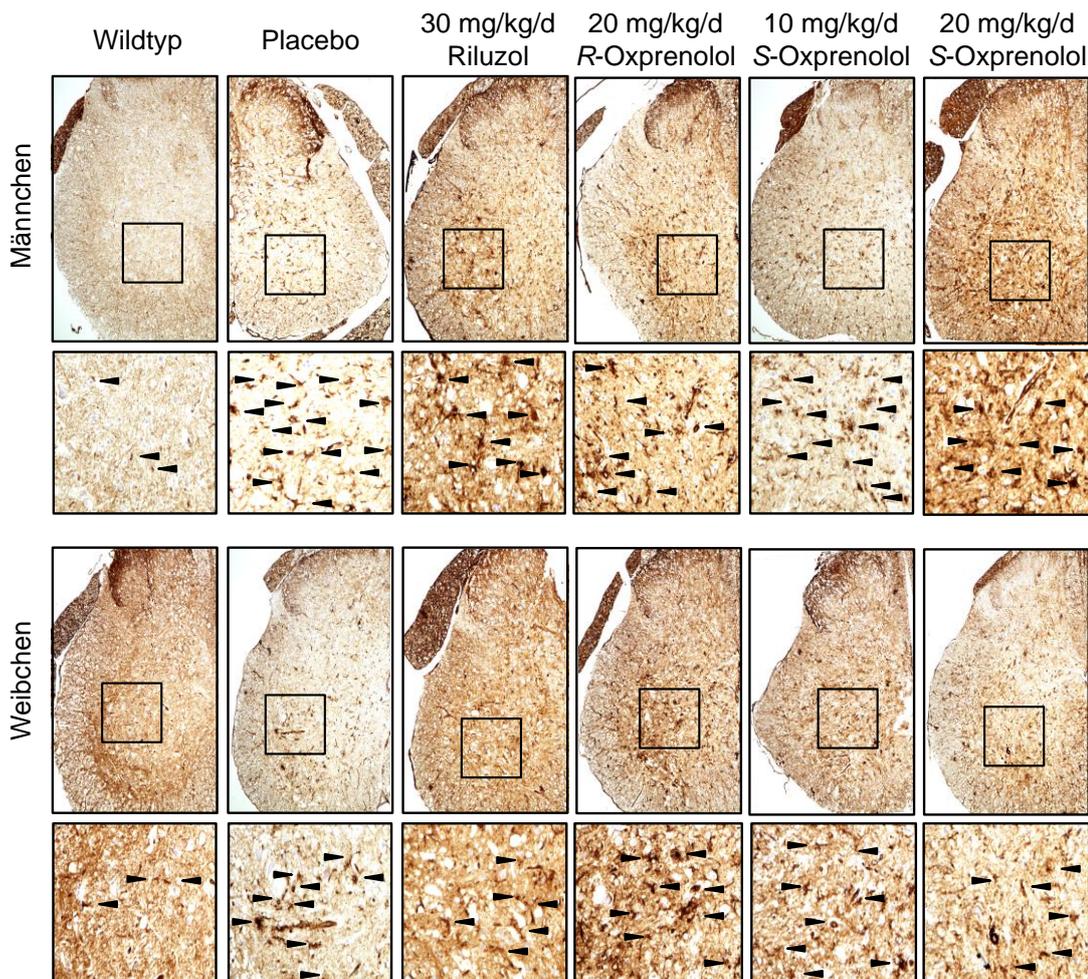
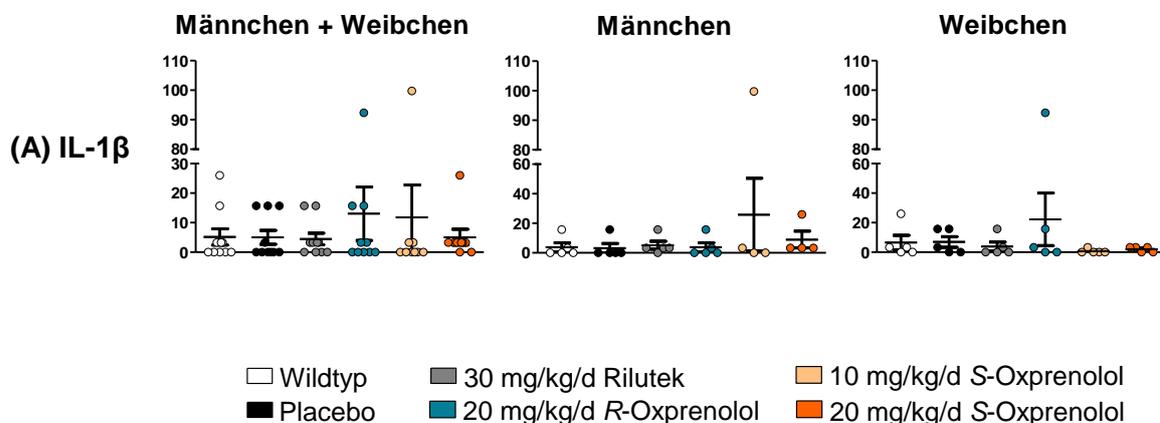


Abbildung 32: RCA-1-Färbung vom lumbalen Rückenmark in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), R-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und S-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Pfeile zeigen beispielhaft RCA-1-positive Mikrogliazellen (braun).

3.3.3.3 Zytokine im Blutplasma

Die Konzentrationen der Zytokine sind in pg/ml angegeben. Die Behandlungen der männlichen und weiblichen WT-Tiere mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und *S*-Oxprenolol (10 oder 20 mg/kg/d) zeigte, im Vergleich zu den Placebos, keine signifikante Veränderungen der Konzentrationen von IL-1 β , IL-2 und TNF- α (Abbildung 33A, B, E). Die IL-6-Konzentration war bei den männlichen WT-Tieren, versus die Placebotiere, signifikant erhöht (Abbildung 33C, $p=0,0159$), was so nicht zu erwarten wäre. Allerdings war die IL-6-Konzentration bei den WT-Weibchen geringer als bei den Placebotieren. Außerdem wurde durch die Behandlung der Weibchen mit 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol die IL-6-Konzentration, verglichen zu Placebotieren, signifikant gesenkt (Abbildung 33C, $p=0,0459$). Die IL-10-Konzentration war bei der kombinierten Gruppe der männlichen und weiblichen WT-Tiere signifikant niedriger als bei den Placebotieren (Abbildung 33D, Männchen und Weibchen: $p=0,0023$, Männchen einzeln: $p=0,0117$). Jedoch blieb die IL-10-Konzentration durch die Behandlung der Männchen und Weibchen mit Rilutek und den β -Blockern, im Vergleich zu Placebotieren, unverändert (Abbildung 33D). Bei der kombinierten Männchen und Weibchen-Gruppe der WT-Tiere sowie bei den WT-Männchen, einzeln betrachtet, war die IFN- γ -Konzentration, verglichen mit der Placebogruppe, signifikant herabgesetzt (Abbildung 33F, Männchen und Weibchen: $p=0,0131$, Männchen einzeln: $p=0,0200$, beide vs. Placebo). Die Behandlung der Männchen und Weibchen mit Rilutek und den β -Blockern ergab keine signifikanten Unterschiede zur Placebogruppe. Allerdings wurde auch deutlich, dass es bei den Männchen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Rilutek- sowie der 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol-Behandlungsgruppe und der WT-Gruppe, im Gegensatz zu den anderen Behandlungsgruppen, gab (Abbildung 33F, Rilutek: $p=0,0670$, 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol: $p=0,0617$, beide vs. WT).



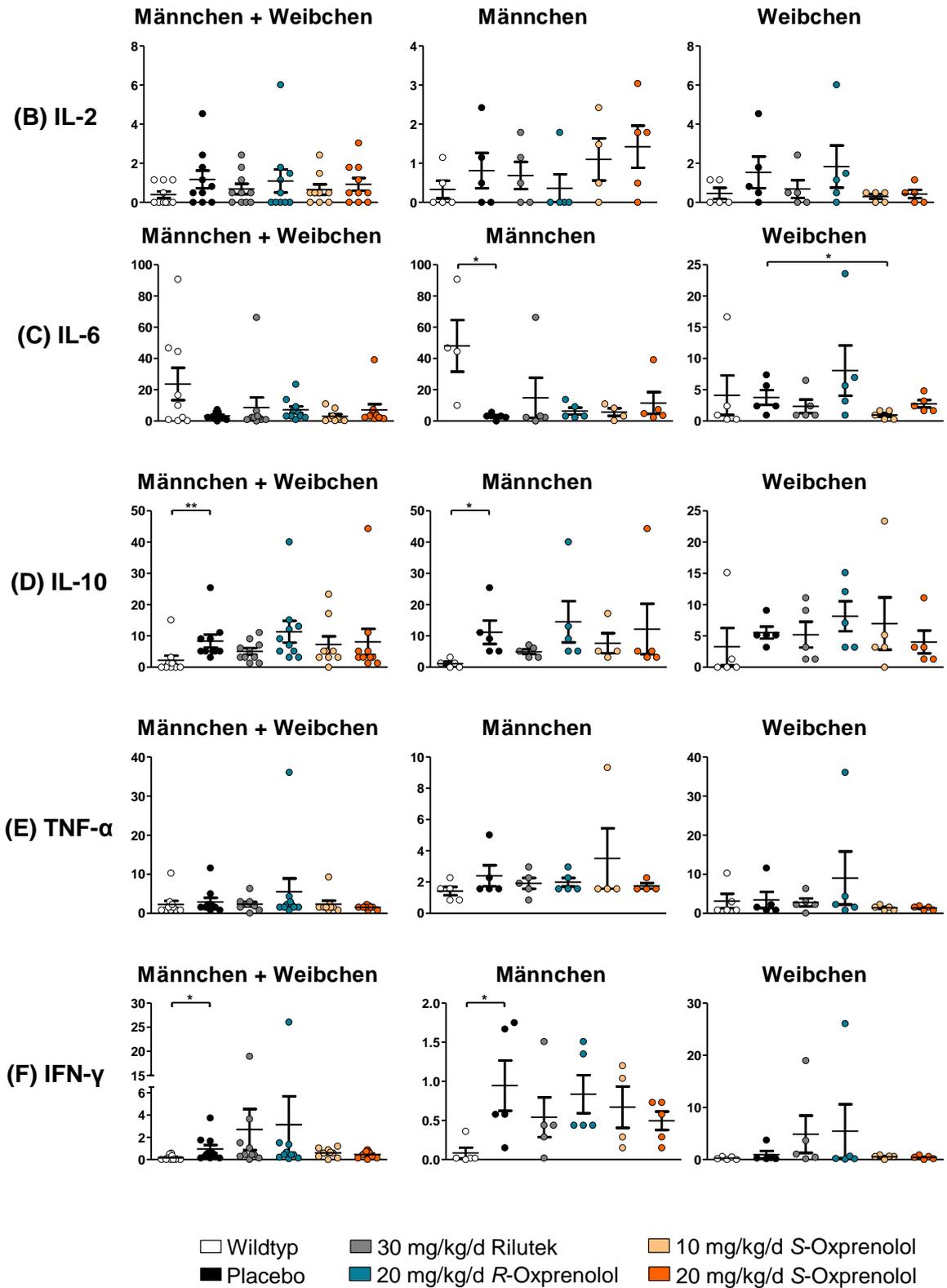


Abbildung 33: Zytokine im Blutplasma [pg/ml] in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), R-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und S-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. Placebo, **: $p < 0,01$ vs. Placebo.

3.3.4 Untersuchung der Atrophie im GC

In der zuvor beschriebenen Vergleichsstudie wurde festgestellt, dass der Verlust der GC- und TA-Masse durch die Behandlung mit *R*- und *S*-Oxprenolol, besonders bei den Weibchen, reduziert werden konnte. Aufgrund dessen wurden in den nächsten Abschnitten Untersuchungen zum Einfluss der Behandlung auf die Atrophie und den katabolen sowie anabolen Proteinstoffwechsel 41 Tage nach Erstsymptomatik im GC durchgeführt.

3.3.4.1 Mikroskopische Untersuchung der Atrophie

Die durchschnittliche Querschnittsfläche der Muskelfasern wurde in μm^2 ermittelt. Die durchschnittliche Größe der Muskelfasern war bei den WT-Tieren größer als bei den Placebotieren (Abbildung 34). Bei der kombinierten WT-Gruppe von Männchen und Weibchen sowie bei den Weibchen, einzeln betrachtet, war die durchschnittliche Muskelfasergröße, im Vergleich zur Placebogruppe, signifikant erhöht (Abbildung 34A, Männchen und Weibchen: $p=0,0005$, Abbildung 34C, Weibchen: $p=0,0079$). Der durchschnittliche Muskelfaserquerschnitt war durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol bei den Männchen (Abbildung 34B) und bei den Weibchen (Abbildung 34C) durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol größer als bei den Placebotieren, jedoch nicht signifikant erhöht. Daher wurde im Folgenden der Behandlungseffekt auf die Verteilung der Muskelfasern untersucht (Abbildung 35 Männchen, Abbildung 37 Weibchen).

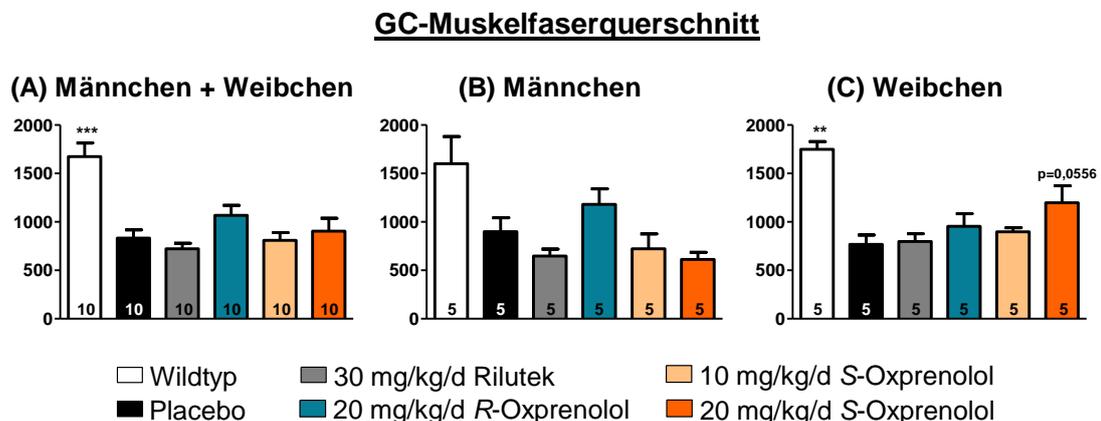


Abbildung 34: Querschnittsfläche der GC-Muskelfasern [μm^2] in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). (A) Männchen und Weibchen, (B) Männchen, (C) Weibchen. Angaben als Mittelwert \pm SEM. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. Placebo. Anzahl der Tiere im Diagrammbalken angegeben.

Der Anteil der größeren Muskelfasern war bei den männlichen gesunden WT-Tieren (Abbildung 35B) und auch bei den mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol behandelten Tieren (Abbildung 35D) größer als bei den Placebotieren. Die Behandlung mit Rilutek und beiden Dosen *S*-Oxprenolol (10 oder 20 mg/kg/d) bewirkte bei den Männchen keine

Veränderung der Größenverteilung der GC-Muskelfasern verglichen mit den Placebos (Abbildung 35C, E, F).

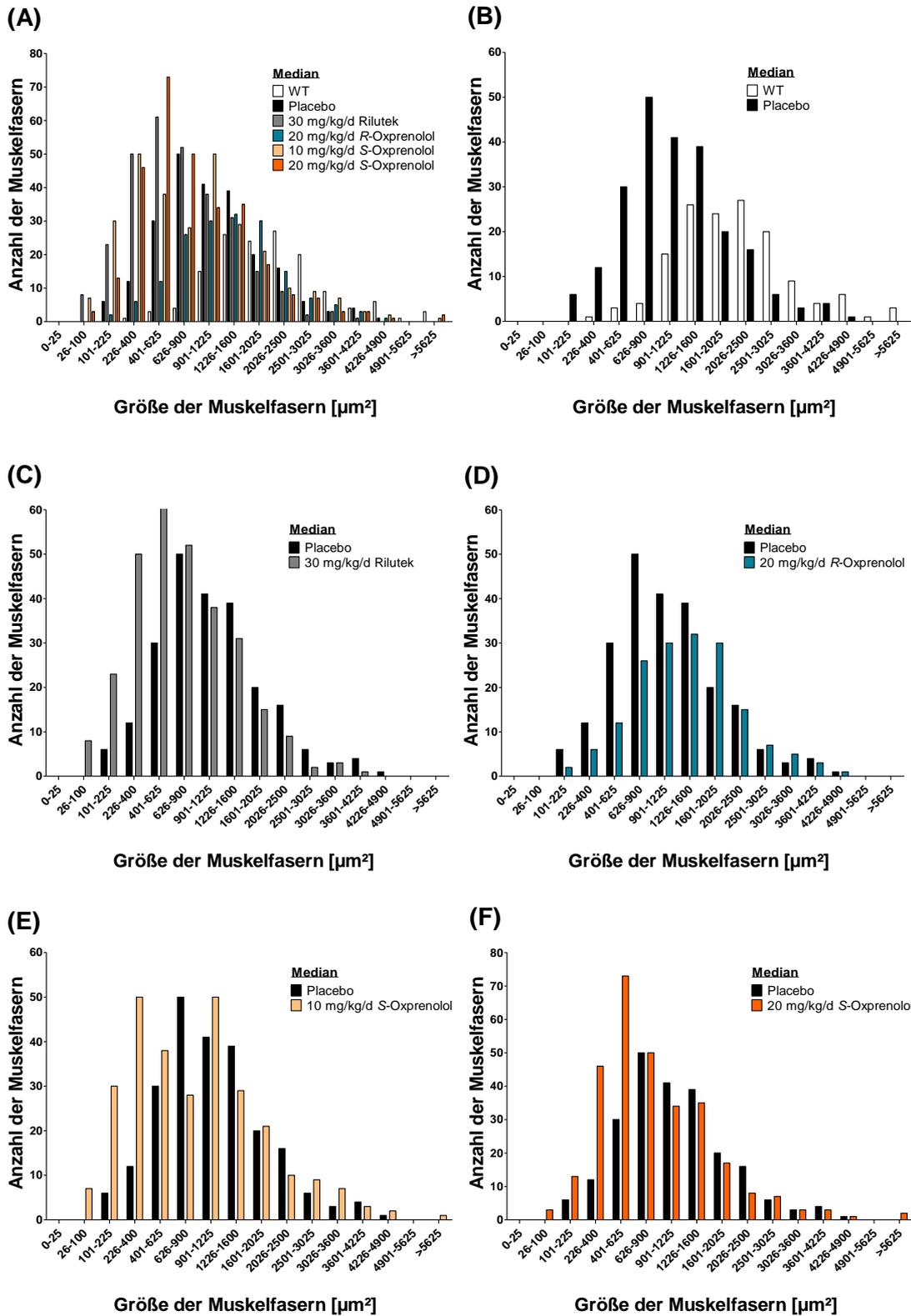


Abbildung 35: Größenverteilung der GC-Muskelfasern in Männchen in der Vergleichsstudie. (A) Zusammenfassung (B) WT-Tiere, (C) 30 mg/kg/d Rilutek, (D) 20 mg/kg/d R-Oxprenolol, (E) 10 mg/kg/d S-Oxprenolol, (F) 20 mg/kg/d S-Oxprenolol, alle vs. Placebo.

Abbildung 36 zeigt repräsentative Bilder von Hämatoxylin Eosin (HE) gefärbten GC-Muskelfasern für die Untersuchung der Atrophie und Größenverteilung der GC-Muskelfasern bei den Männchen. Dargestellt sind GC-Muskelfasern vom WT, Placebo und mit Behandlung von 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol, 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol sowie 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol.

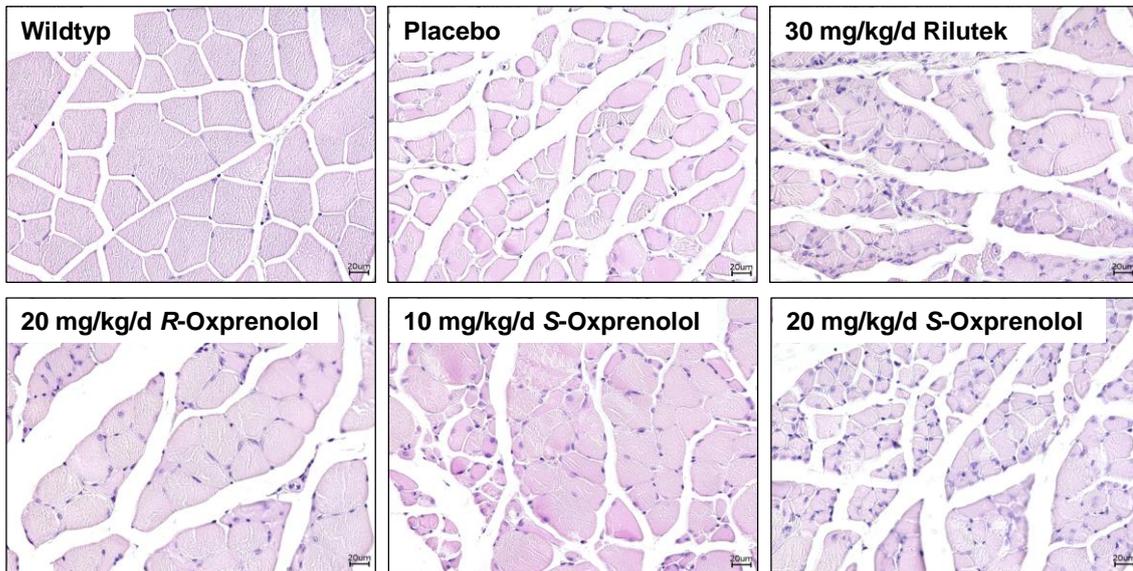


Abbildung 36: HE-Färbung vom GC der Männchen in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Maßstabsbalken: 20µm.

Bei den WT-Weibchen (Abbildung 37B) sowie bei den Tieren, die mit 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol (Abbildung 37F) behandelt wurden, war der Anteil an größeren Muskelfasern, im Vergleich zur Placebogruppe, am höchsten. Die Behandlung mit Rilutek und 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol sowie der geringeren *S*-Oxprenolol Dosis (10 mg/kg/d) zeigte, verglichen mit Placebotieren, nur einen geringen Anstieg an größeren Muskelfasern (Abbildung 37C, D, E).

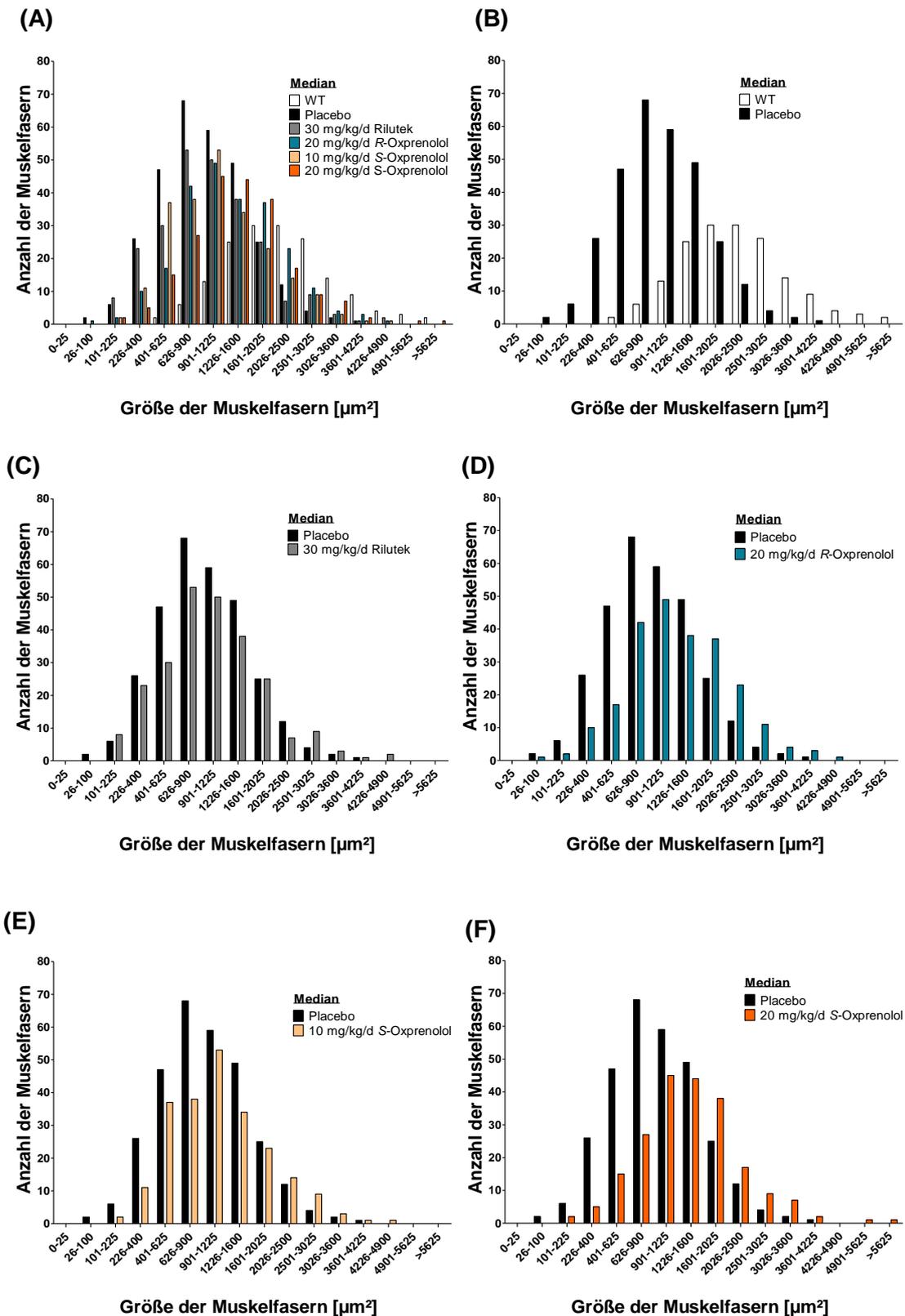


Abbildung 37: Größenverteilung der GC-Muskelfasern in Weibchen in der Vergleichsstudie. (A) Zusammenfassung (B) WT-Tiere, (C) 30 mg/kg/d Rilutek, (D) 20 mg/kg/d R-Oxprenolol, (E) 10 mg/kg/d S-Oxprenolol, (F) 20 mg/kg/d S-Oxprenolol, alle vs. Placebo.

In Abbildung 38 sind repräsentative Bilder von HE-gefärbten GCs dargestellt. Die Bilder zeigen die Größenverteilung der GC-Muskelfasern in weiblichen WT-Tieren,

Placebos und mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol sowie *S*-Oxprenolol behandelte Tiere.

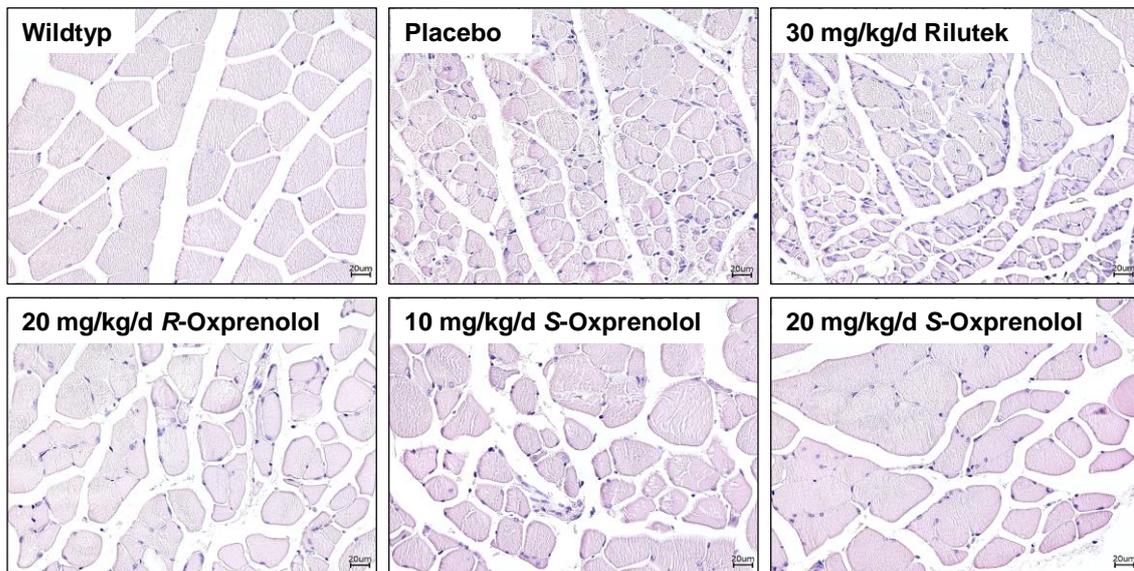


Abbildung 38: HE-Färbung vom GC der Weibchen in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), *R*-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und *S*-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Maßstabsbalken: 20µm.

3.3.4.2 Regulation des Proteinstoffwechsels im GC

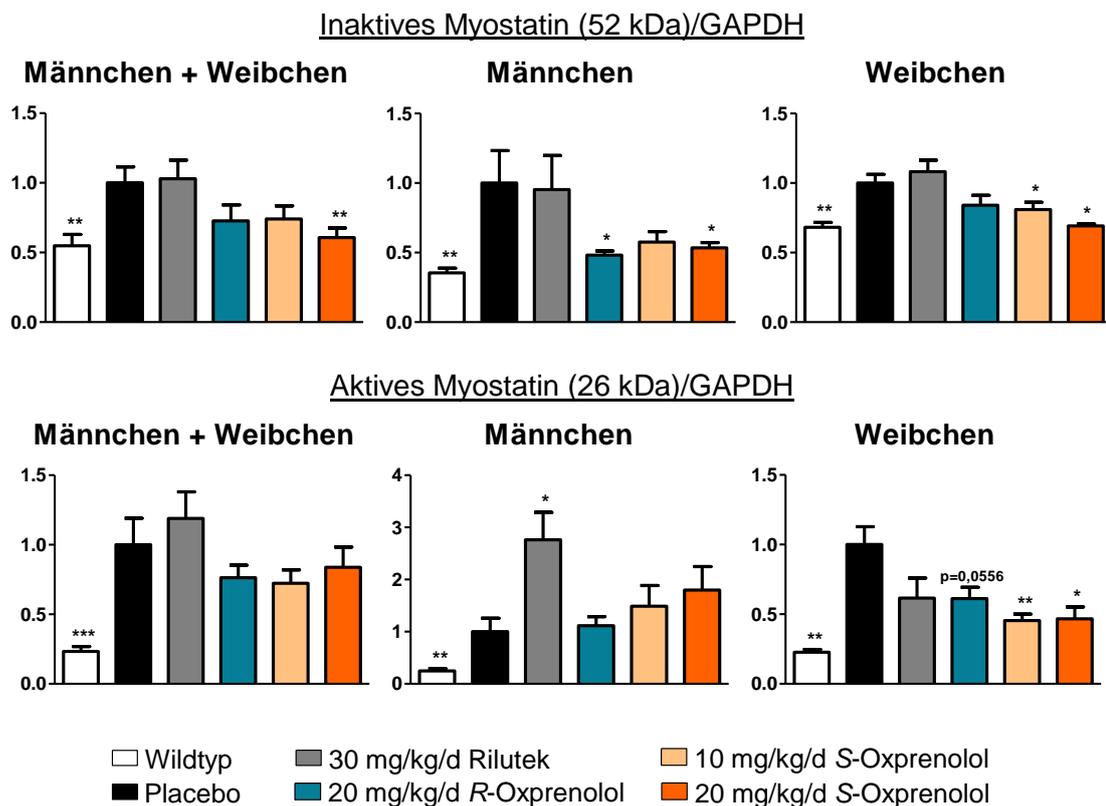
Muskelatrophie wird durch verschiedene katabolische Mechanismen ausgelöst. Hierbei kommt es durch das UPS, durch Apoptose über die Aktivierung von Caspasen und auch durch Autophagie zum Proteinabbau. In den folgenden Abschnitten wurden Behandlungseffekte auf Komponenten des Proteinmetabolismus im GC 41 Tage nach Erstsymptomatik näher untersucht.

3.3.4.3 Myostatin

Die relative Proteinexpression vom inaktiven sowie vom aktiven Myostatin im GC der gesunden männlichen als auch weiblichen WT-Tiere lag, im Vergleich zu den kranken Placebotieren, signifikant reduziert vor (Abbildung 39A). Die mit Rilutek-behandelten Männchen zeigten, im Vergleich zu Placebos, keine signifikante Änderung des inaktiven Myostatin-Proteinlevels. Jedoch wurde der Proteinlevel des aktiven Myostatins durch Rilutek, verglichen mit der Placebogruppe, bei den Männchen signifikant erhöht (Abbildung 39). Durch die Behandlung der Männchen mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol kam es, verglichen mit Placebotieren, zu einer signifikanten Reduktion der inaktiven Myostatin-Form (Abbildung 39A), allerdings zu keiner signifikanten Verminderung der aktiven Myostatin-Form. Die Behandlung der Weibchen mit beiden Dosen *S*-Oxprenolol (10 und 20 mg/kg/d) führte, versus Placebotieren, zu einer signifikant erniedrigten inaktiven als auch aktiven Myostatin-Proteinexpression im GC (Abbildung 39). Gesunde WT-Tiere wiesen, verglichen mit den Placebos, eine signifikant erniedrigte relative Follistatin-Expression auf (Abbildung

39B). Die Behandlung mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol als auch mit 10 bzw. 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol zeigte, im Vergleich zur Placebogruppe, keine signifikante Änderung der relativen Proteinexpression von Follistatin (Abbildung 39B). Der ActRIIB-Proteinlevel war bei den männlichen WT-Tieren, im Vergleich zur Placebogruppe, reduziert und bei den Weibchen, verglichen mit den Placebos, signifikant verringert (Abbildung 39C). Der relative Proteinlevel von ActRIIB war durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol, versus der Placebogruppe, bei den Weibchen signifikant gesenkt (Abbildung 39C, $p=0,0286$). Die anderen Behandlungsgruppen hatten bei den Männchen und Weibchen, versus Placebotiere, keine Änderung des ActRIIB-Proteinlevels zur Folge (Abbildung 39C). Bei den männlichen WT-Tieren kam es, verglichen zu Placebotieren, zu einer signifikanten Reduktion der pSMAD2/3-Proteinexpression im GC (Abbildung 39D). Wurden die männlichen Tiere mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol oder beiden Dosen *S*-Oxprenolol behandelt, war die relative pSMAD 2/3-Proteinexpression, im Vergleich zu Placebotieren, signifikant herabgesetzt (Abbildung 39D, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol: $p=0,0317$, 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol: $p=0,0079$, 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol: $p=0,0159$, alle vs. Placebo). Bei den Weibchen hingegen führte die Behandlung mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol, verglichen mit Placebos, zu einer signifikanten Erhöhung der relativen pSMAD2/3-Proteinexpression (Abbildung 39D, $p=0,0079$).

(A) Relative Myostatin/GAPDH-Proteinexpression [au]



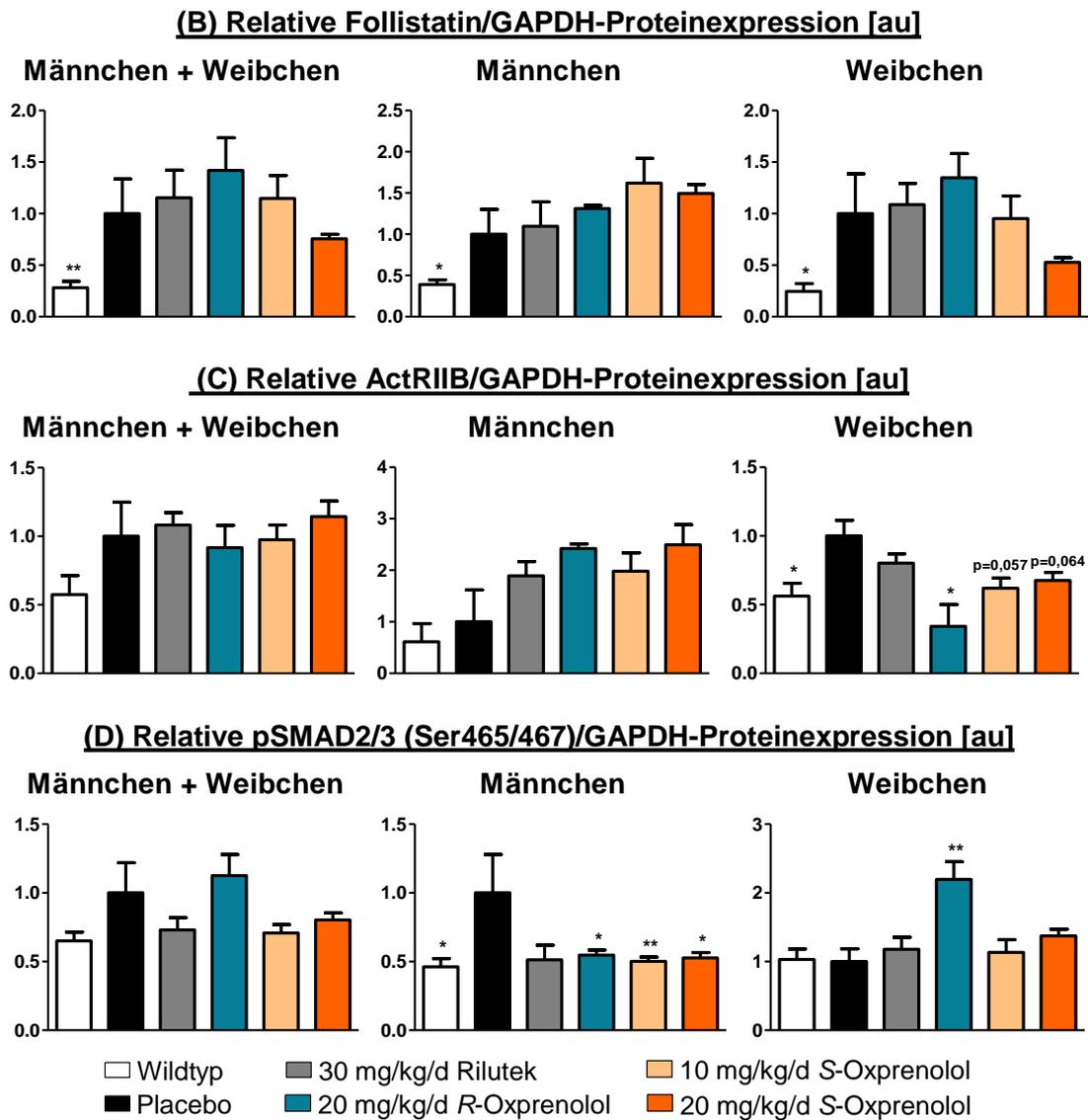


Abbildung 39: Behandlungseffekte auf die Myostatin-Signalkaskade im GC in der Vergleichsstudie. (A) relative Myostatin/GAPDH Proteinexpression [au], (B) relative Follistatin/GAPDH Proteinexpression [au], (C) relative ActRIIB/GAPDH Proteinexpression [au] und (D) relative pSMAD2 (Ser465/467)/GAPDH Proteinexpression [au]. Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. Placebo. ActRIIB= Activin Rezeptor Typ IIB.

Abbildung 40 zeigt die Western Blot-Membranen zur Untersuchung der Behandlungseinflüsse von β -Blockern auf die Myostatin-Signalkaskade. Die numerische Auswertung ist in der Tabelle 32 im Anhang angegeben.

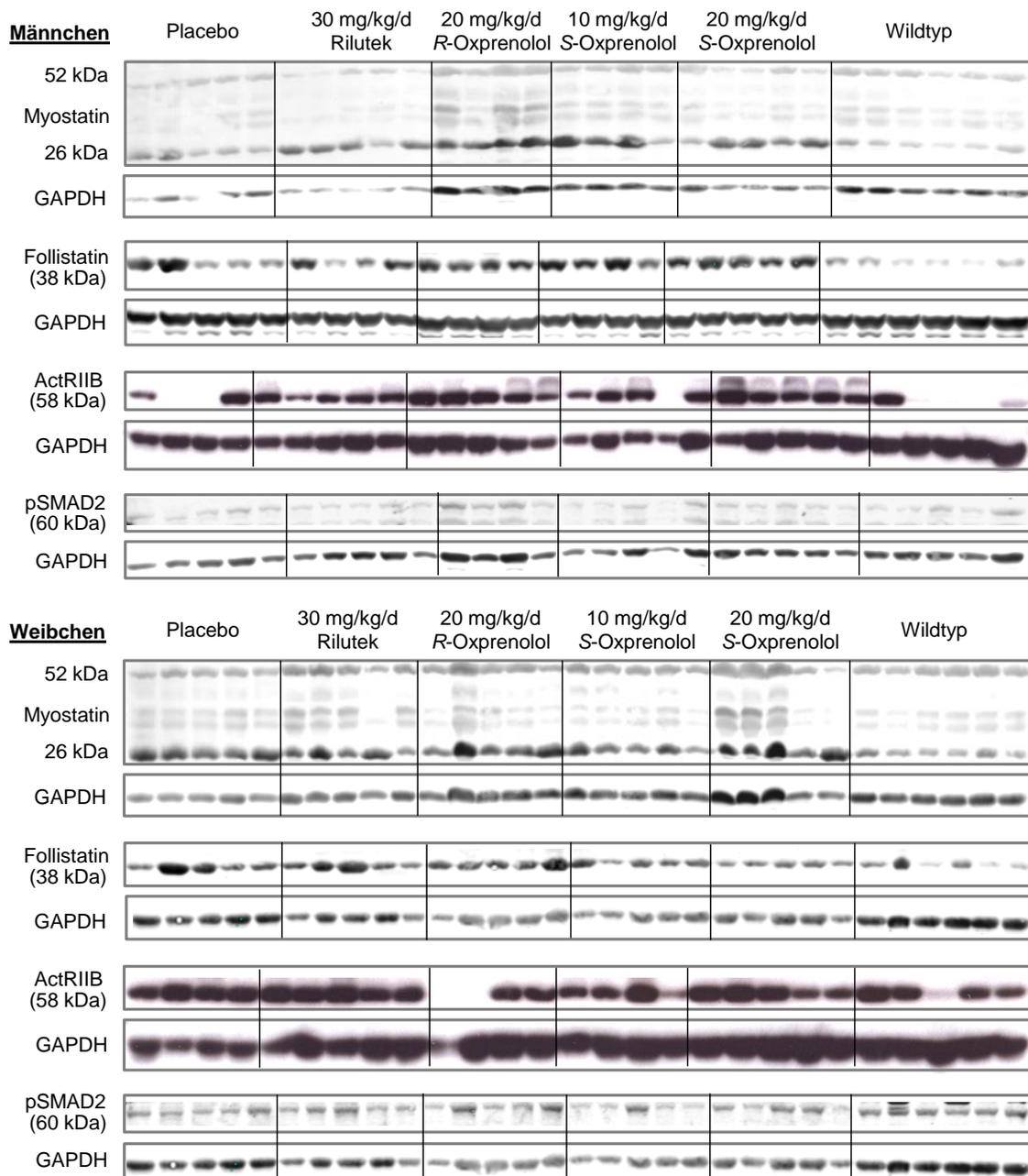


Abbildung 40: Western Blot-Abbildungen zur Analyse von Behandlungseffekten auf die Myostatin-Signalkaskade im GC in der Vergleichsstudie.

3.3.4.4 Atrophiemarker

Der folgende Abschnitt befasst sich mit der relativen Proteinexpressionsrate der E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF1 und MAFbx im GC.

Bei den männlichen WT-Tieren war der MuRF1-Proteinlevel, im Vergleich zur Placebogruppe, signifikant reduziert (Abbildung 41A). Die relative Proteinexpression von MuRF1 wurde bei den Männchen durch die Behandlung mit 10 mg/kg/d S-Oxprenolol als auch mit 20 mg/kg/d S-Oxprenolol, verglichen mit der Placebogruppe, signifikant gesenkt (Abbildung 41A, 10 mg/kg/d S-Oxprenolol: $p=0,0159$, 20 mg/kg/d S-Oxprenolol: $p=0,0317$, beide vs. Placebo). Bei den Weibchen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT- und Placebotieren bezüglich der

MuRF1-Proteinexpression (Abbildung 41A). Es zeigten sich bei den Weibchen auch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der relativen Proteinexpression von MuRF1, im Vergleich zu den Placebotieren, wenn sie mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und *S*-Oxprenolol (10 oder 20 mg/kg/d) behandelt wurden (Abbildung 41A). Der MAFbx-Proteinlevel war bei den männlichen WT-Tieren, versus die Placebos, nicht signifikant verändert (Abbildung 41B). Jedoch wurde die relative MAFbx-Proteinexpression durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol bei den Männchen, versus der Placebogruppe, signifikant erhöht (Abbildung 41B, $p=0,0286$). Bei den weiblichen WT-Tieren war der MAFbx-Proteinlevel, verglichen mit der Placebogruppe, signifikant reduziert (Abbildung 41B). Jedoch gab es bezüglich der MAFbx-Proteinexpression bei den Weibchen nach Behandlung mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und beiden Dosen *S*-Oxprenolol, im Vergleich zur Placebogruppe, keine signifikanten Unterschiede. Wobei allerdings die Behandlung mit 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol zur größten Reduktion des MAFbx-Proteinlevels führte (Abbildung 41B).

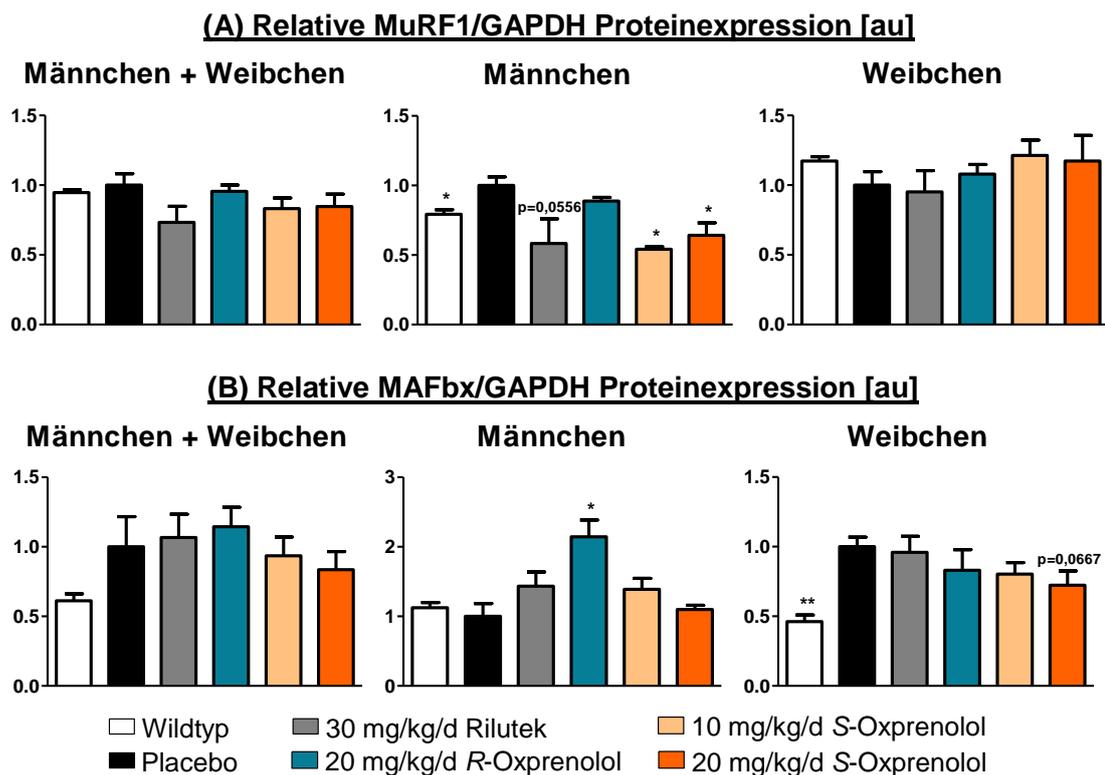


Abbildung 41: Behandlungseffekt auf die Atrophiemarker MuRF1 und MAFbx im GC in der Vergleichsstudie. (A) relative MuRF1/GAPDH Proteinexpression [au], (B) relative MAFbx/GAPDH Proteinexpression [au]. Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$ vs. Placebo.

Abbildung 42 zeigt die Western Blot-Membranen für die Auswertung der relativen Proteinexpression von MuRF1 und MAFbx. Tabelle 33 im Anhang fasst die Ergebnisse der Analyse zusammen.

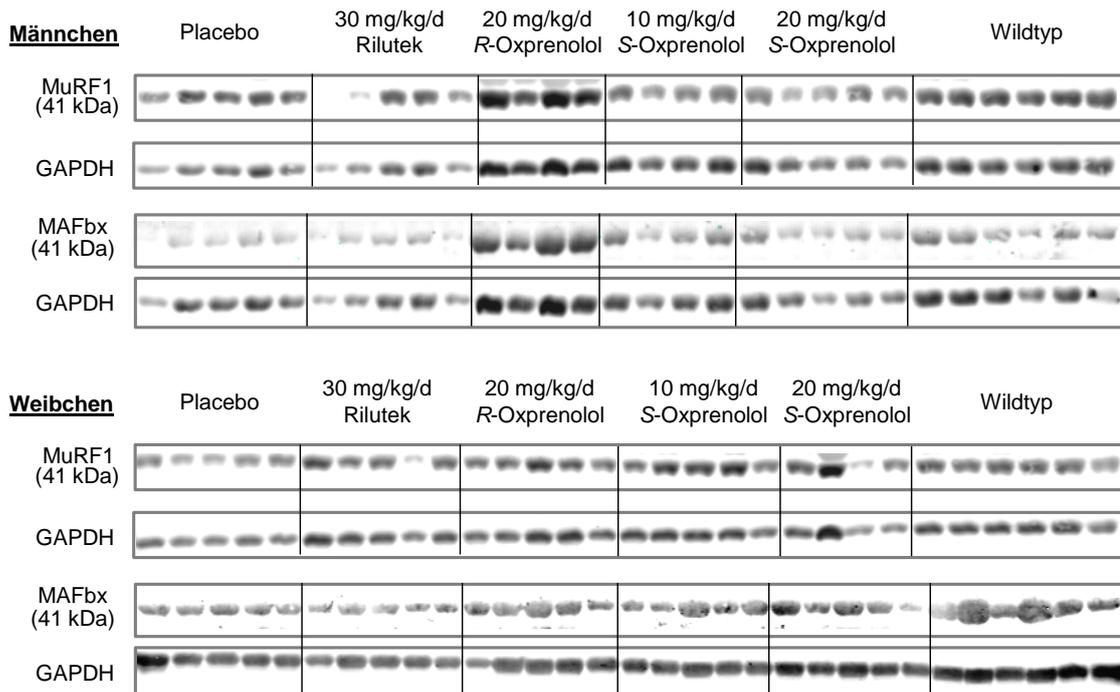


Abbildung 42: Western Blot-Abbildungen zur Analyse von Behandlungseffekten auf die Atrophiemarker MuRF1 und MAFbx im GC in der Vergleichsstudie.

3.3.4.5 Akt-Signalkaskade

Der nächste Abschnitt beschäftigt sich mit Proteinen, die sich positiv auf den Anabolismus des GC auswirken können. Dabei wurde die Phosphorylierung der Akt-, der AMPK- sowie der FoxO1-, FoxO3a-Proteine näher untersucht.

Die Akt-Phosphorylierung am Threonin 308 (Thr308) ergab zwischen männlichen und weiblichen WT- und Placebotieren keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 43A). Jedoch war die relative Akt-Phosphorylierung (Thr308) bei den Männchen als auch bei den Weibchen durch die Behandlung mit beiden Dosen S-Oxprenolol (10 und 20 mg/kg/d), versus die Placebos, herabgesetzt (Abbildung 43A). Die Behandlung mit 20 mg/kg/d S-Oxprenolol führte bei den Männchen, verglichen mit den Placebotieren, zu einer signifikanten Reduzierung der relativen Akt-Phosphorylierung (Thr308) (Abbildung 43A, $p=0,0286$). In der kombinierten Männchen und Weibchen-Gruppe wurde die relative Akt-Phosphorylierung (Thr308) ebenfalls durch die Behandlung mit beiden Dosen S-Oxprenolol (10 oder 20 mg/kg/d), im Vergleich zur Placebogruppe, signifikant vermindert (Abbildung 43A, 10 mg/kg/d S-Oxprenolol: $p=0,0056$, 20 mg/kg/d S-Oxprenolol: $p=0,0172$, beide vs. Placebo). Die Akt-Phosphorylierung am Serin (Ser473) war bei den männlichen als auch weiblichen WT-Tieren, im Vergleich zu Placebos, signifikant erhöht. Die Behandlung der Männchen mit Rilutek, 20 mg/kg/d R-Oxprenolol sowie beiden Dosen S-Oxprenolol beeinflusste die relative Akt-Phosphorylierung (Ser473), verglichen mit den Placebos, nicht (Abbildung 43B). Bei

den Weibchen führte die Behandlung mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und mit der höheren Dosis *S*-Oxprenolol, im Vergleich zur Placebogruppe, zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Akt-Phosphorylierung (Ser473) (Abbildung 43B, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol: $p=0,0159$, 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol: $p=0,0317$, beide vs. Placebo). Die AMPK-Phosphorylierung war bei den WT-Männchen, verglichen mit Placebotieren, unverändert (Abbildung 43C). Jedoch wiesen WT-Weibchen, im Vergleich zu Placebos, eine signifikante Reduktion der AMPK-Phosphorylierung auf. Bei den Männchen und Weibchen, einzeln betrachtet, gab es keine signifikanten Veränderungen zwischen den Behandlungsgruppen, versus die Placebotiere, bezüglich der AMPK-Phosphorylierung. Allerdings wurde die AMPK-Phosphorylierung in der kombinierten Männchen und Weibchen-Gruppe durch die Behandlung mit Rilutek und beiden Dosen *S*-Oxprenolol signifikant reduziert (Abbildung 43C, Rilutek: $p=0,0418$, 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol: $p=0,0418$, 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol: $p=0,0188$, alle vs. Placebo). Die FoxO1-Phosphorylierung war bei den gesunden WT-Tieren, im Vergleich zu den kranken Placebotieren, signifikant erhöht (Abbildung 43D). Die Behandlung mit sowohl 10 als auch 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol ergab, im Vergleich zu den Placebos, bei den Männchen, aber nicht bei den Weibchen, eine signifikante Erhöhung der relativen FoxO1-Phosphorylierung. Jedoch wurde in der kombinierten Männchen und Weibchen-Gruppe ein signifikanter Anstieg der FoxO1-Phosphorylierung festgestellt (Abbildung 43D, 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol: $p=0,0464$, 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol: $p=0,0106$; beide vs. Placebo). Bei den männlichen als auch weiblichen WT-Versuchstieren wurden keine signifikanten Unterschiede der FoxO3a-Phosphorylierung, versus Placebotieren, deutlich (Abbildung 43E). Allerdings führte bei den Männchen die Behandlung mit 10 oder 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol, verglichen mit Placebotieren, zu einem signifikanten Abfall der relativen FoxO3a-Phosphorylierung (Abbildung 43E, 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol: $p=0,0159$, 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol: $p=0,0159$, beide vs. Placebo). Die Behandlung der weiblichen Tiere hingegen zeigte, im Vergleich zu Placebos, keinen Einfluss auf die relative FoxO3a-Phosphorylierung (Abbildung 43E).

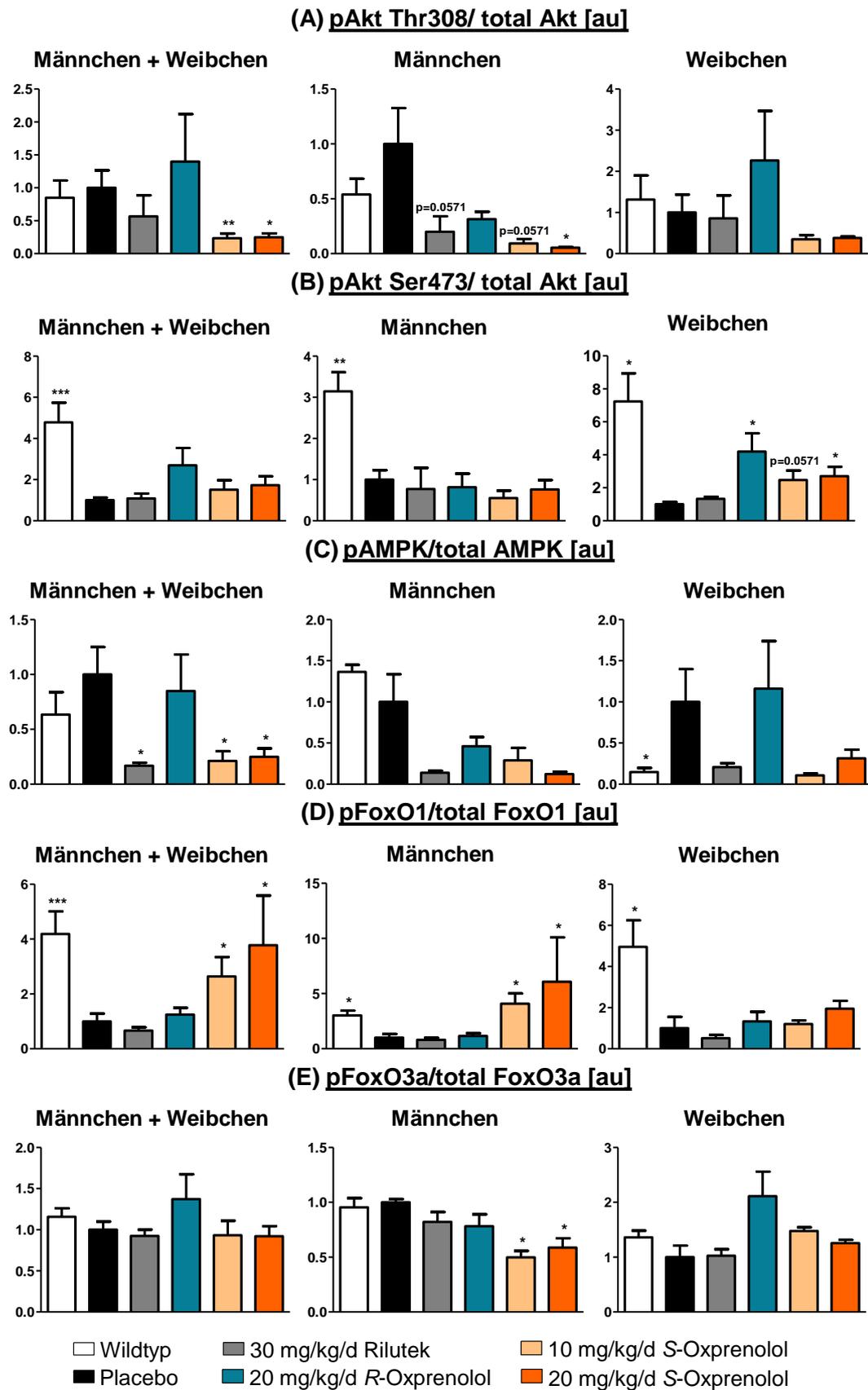


Abbildung 43: Behandlungseffekte auf die Akt-Signalkaskade im GC in der Vergleichsstudie. (A) relative Akt-Phosphorylierung [au], (B) relative AMPK-Phosphorylierung [au], (C) relative FoxO1-Phosphorylierung [au] und (D) relative FoxO3a-Phosphorylierung [au]. Normalisierung zu GAPDH. Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. Placebo. Thr= Threonin, Ser= Serin

Abbildung 44 zeigt die Western Blot-Membranen zur Untersuchung der Behandlungseffekte auf die Akt-Signalkaskade im GC in der Vergleichsstudie.

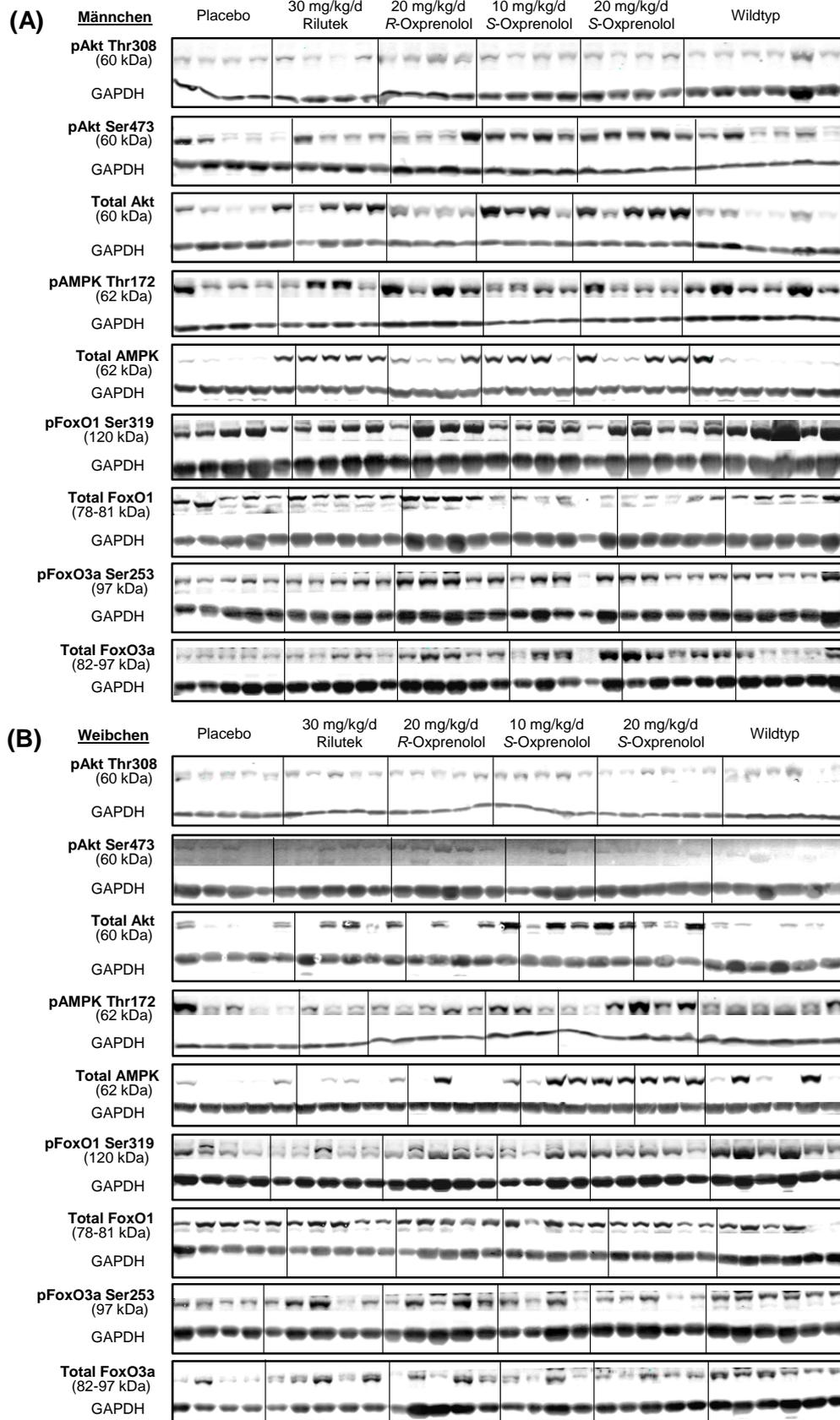
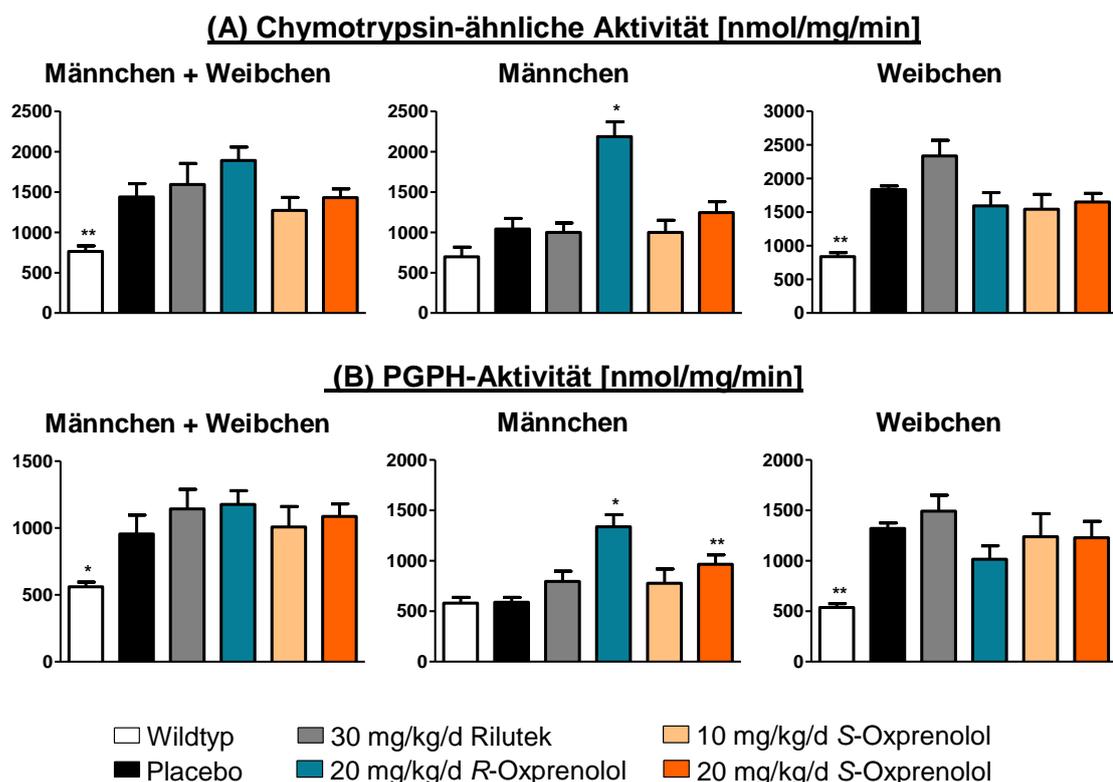


Abbildung 44: Western Blot-Abbildungen zur Analyse von Behandlungseffekten auf die Akt-Signalkaskade in der Vergleichsstudie. (A) Männchen und (B) Weibchen.

3.3.4.6 UPS

3.3.4.6.1 UPS-Aktivität

Bei den WT-Tieren wurde eine, teilweise auch signifikant, verminderte UPS-Aktivität im GC, im Vergleich zu den Placebos, nachgewiesen (Abbildung 45). Durch die Behandlung der männlichen Tiere mit Rilutek blieb die Chymotrypsin-ähnliche (Abbildung 45A) und PGPH Aktivität (Abbildung 45B), verglichen mit Placebos, unverändert, wohingegen die Trypsin-ähnliche Aktivität signifikant vermindert wurde (Abbildung 45C, $p=0,0159$). Die Behandlung der Männchen mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol führte, verglichen mit der Placebogruppe, zu einer signifikanten Erhöhung der Chymotrypsin-ähnliche (Abbildung 45A, $p=0,0286$), PGPH- (Abbildung 45B, $p=0,0286$) und Trypsin-ähnliche Aktivität (Abbildung 45C, $p=0,0286$). Die Behandlung mit der höheren Dosis *S*-Oxprenolol zeigte, versus Placebotieren, ebenfalls eine signifikant erhöhte PGPH-Aktivität bei den Männchen (Abbildung 45B, $p=0,0095$). Bei den Weibchen hingegen führte die Behandlung mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol, sowie beiden Dosen *S*-Oxprenolol (10 oder 20 mg/kg/d) zu einer verminderten UPS-Aktivität (Abbildung 45). Die Trypsin-ähnliche Aktivität wurde durch die Behandlung mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und beiden Dosen *S*-Oxprenolol, verglichen mit der Placebogruppe, signifikant gesenkt (Abbildung 45C, Rilutek: $p=0,0159$, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol: $p=0,0286$, 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol: $p=0,0286$, 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol: $p=0,0159$, alle vs. Placebo).



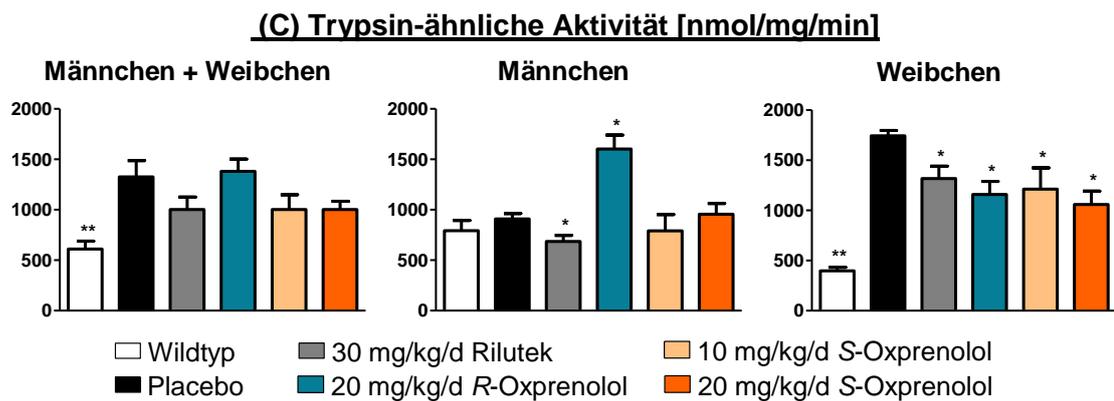
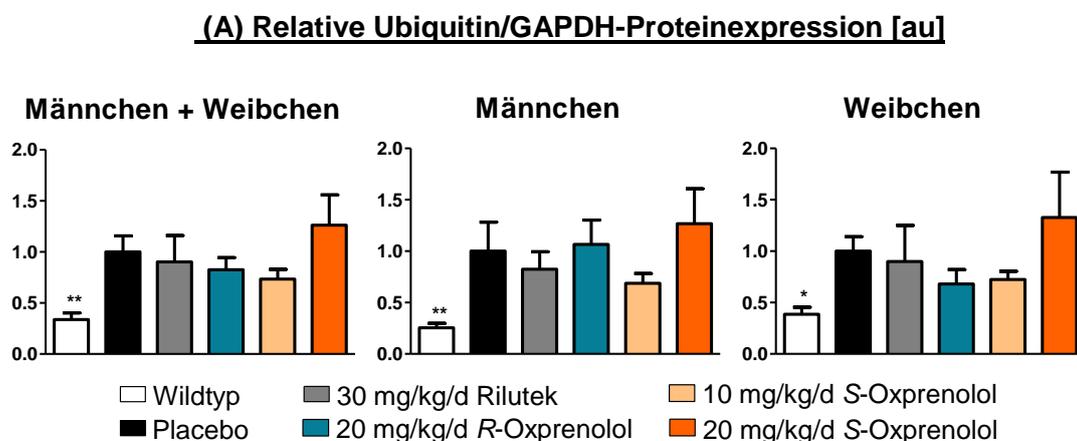


Abbildung 45: UPS-Aktivität [nmol/mg/min] im GC in der Vergleichsstudie. (A) Chymotrypsin-ähnliche Aktivität, (B) Petidyl-Glutamyl-Peptid-Hydrolase (PGPH)-Aktivität und (C) Trypsin-ähnliche Aktivität. Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ vs. Placebo.

Tabelle 34 im Anhang fasst die Ergebnisse zur Untersuchung der UPS-Aktivität im GC in der Vergleichsstudie zusammen.

3.3.4.6.2 Ubiquitin-Proteinlevel

Die erniedrigte UPS-Aktivität in den WT-Tieren konnte mit der relativen Ubiquitin-Proteinexpression bestätigt werden. Die WT-Tiere wiesen, verglichen zur Placebogruppe, einen signifikant reduzierten Ubiquitin-Proteinlevel auf (Abbildung 46A, Männchen und Weibchen kombiniert: $p = 0,0017$, Männchen: $p = 0,0043$, Weibchen: $p = 0,0303$). Jedoch ergab die Western Blot-Analyse, im Vergleich zur Placebogruppe, keine signifikanten Veränderungen des Ubiquitin-Proteinlevels bei den Männchen und Weibchen durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und mit beiden Dosen *S*-Oxprenolol (Abbildung 46A). In Abbildung 46B sind die verwendeten Western Blot Membranen zur Auswertung des relativen Ubiquitin-Proteinlevels gezeigt.



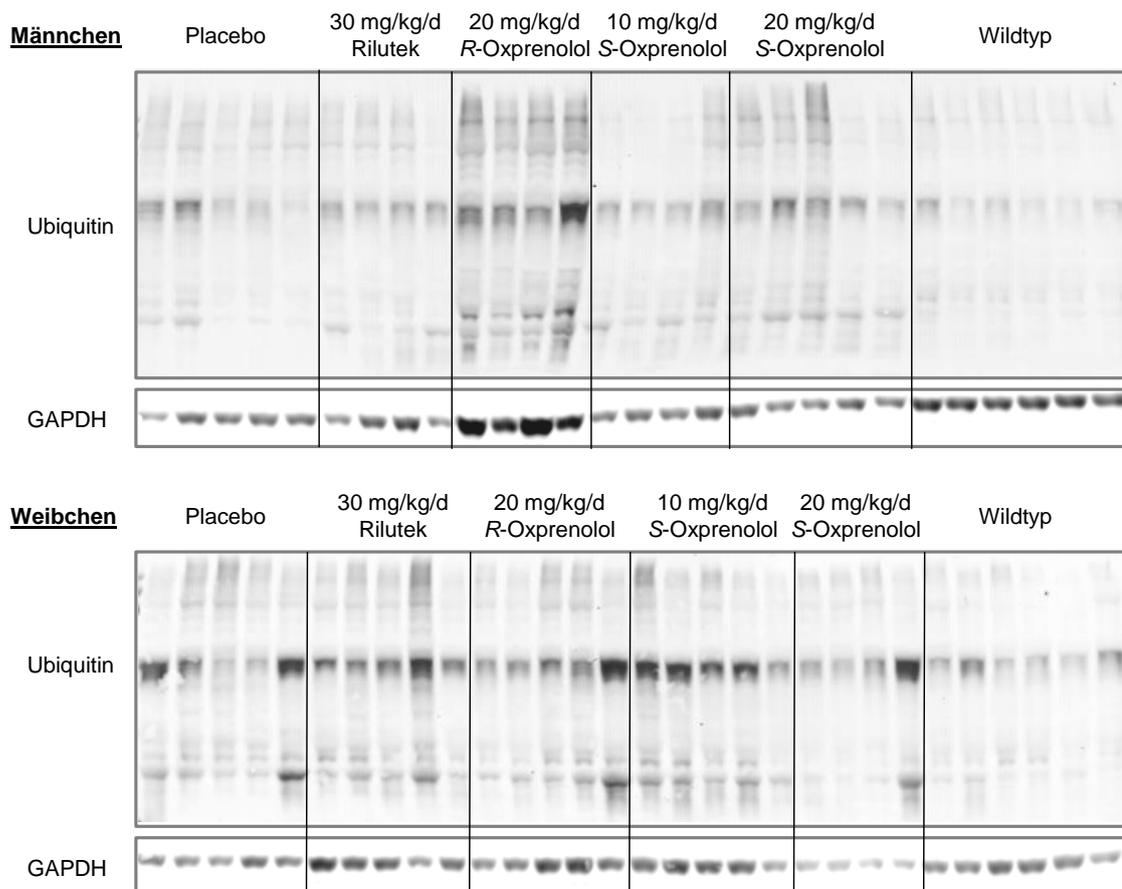
(B) Western Blot-Membranen

Abbildung 46: Untersuchung des relativen Ubiquitin-Proteinlevel im GC in der Vergleichsstudie. (A) Darstellung der Ergebnisse der relativen Ubiquitin/GAPDH Proteinexpression [au] und (B) den dazugehörigen Western Blot-Membranen. Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ vs. Placebo.

3.3.4.7 Apoptose**3.3.4.7.1 Caspase-Aktivität**

Die Caspase-3- und Caspase-6-Aktivität war bei den WT-Tieren, im Vergleich zu Placebotieren, herabgesenkt (Abbildung 47). Die Caspase-3-Aktivität war bei den Männchen durch die 10 und 20 mg/kg/d S-Oxprenolol-Behandlung, verglichen mit Placebotieren, signifikant erhöht (Abbildung 47A, 10 mg/kg/d S-Oxprenolol: $p = 0,0286$, 20 mg/kg/d S-Oxprenolol: $p = 0,0286$, beide vs. Placebo). Die Weibchen hingegen zeigten keine signifikanten Unterschiede der Caspase-3-Aktivität durch die Behandlung mit Rilutek und den β -Blockern (Abbildung 47A). Allerdings wurde die Caspase-3-Aktivität bei den weiblichen Tieren durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d S-Oxprenolol, im Vergleich zu Placebotieren, am stärksten reduziert (Abbildung 47A). Die Behandlung mit Rilutek, 20 mg/kg/d R-Oxprenolol sowie S-Oxprenolol zeigte keine signifikanten Änderungen der Caspase-6-Aktivität bei den Männchen und Weibchen, einzeln betrachtet (Abbildung 47B). Jedoch führte die Behandlung mit 10 mg/kg/d S-

Oxprenolol in der kombinierten Männchen und Weibchen-Gruppe, im Vergleich zur Placebogruppe, zu einer signifikanten Erhöhung der Caspase-6-Aktivität (Abbildung 47B, $p=0,0289$). Tabelle 35 im Anhang fasst die Ergebnisse zur Aktivitätsanalyse der Caspase-3 und Caspase-6 im GC zusammen.

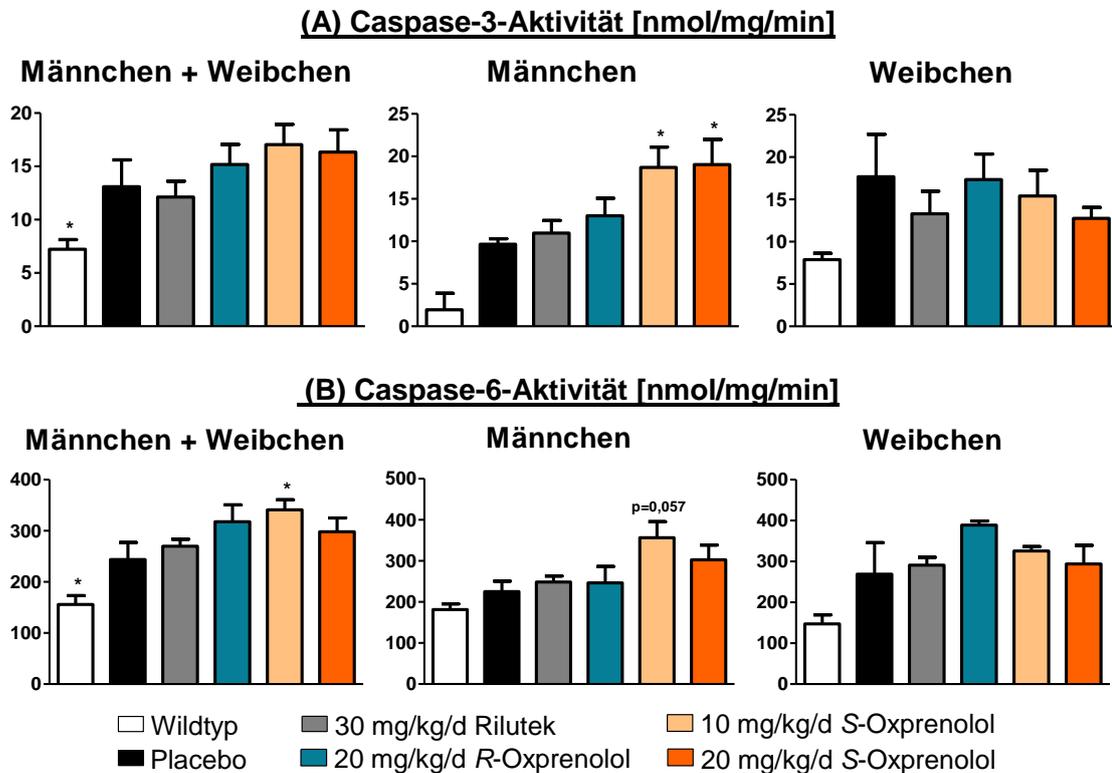
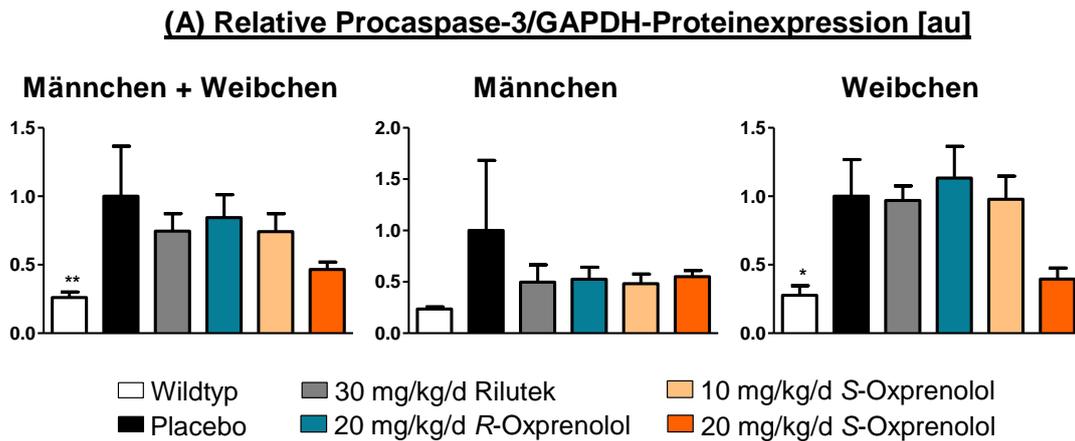


Abbildung 47: Caspase-Aktivität [nmol/mg/min] im GC in der Vergleichsstudie. (A) Caspase-3 und (B) Caspase-6. Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. Placebo.

3.3.4.7.2 Procaspase-3-Proteinlevel

Der relative Procaspase-3-Proteinlevel der WT-Tiere war, im Vergleich zu den Placebotieren, erniedrigt (Abbildung 48A). Durch die Behandlung mit Rilutek und 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol sowie mit 10 oder 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol wurde die relative Procaspase-3-Proteinexpression in der kombinierten Gruppe der Männchen und Weibchen sowie bei den Männchen, einzeln betrachtet, reduziert (Abbildung 48A). Bei den Weibchen zeigte die Behandlung mit 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol mit einer 60%igen Reduzierung des relativen Caspase-3-Proteinlevels, im Vergleich zur Placebogruppe, die stärkste Veränderung (Abbildung 48, Placebo: $1,00 \pm 0,27$ au, 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol: $0,39 \pm 0,08$ au).



(B) Western Blot-Membranen

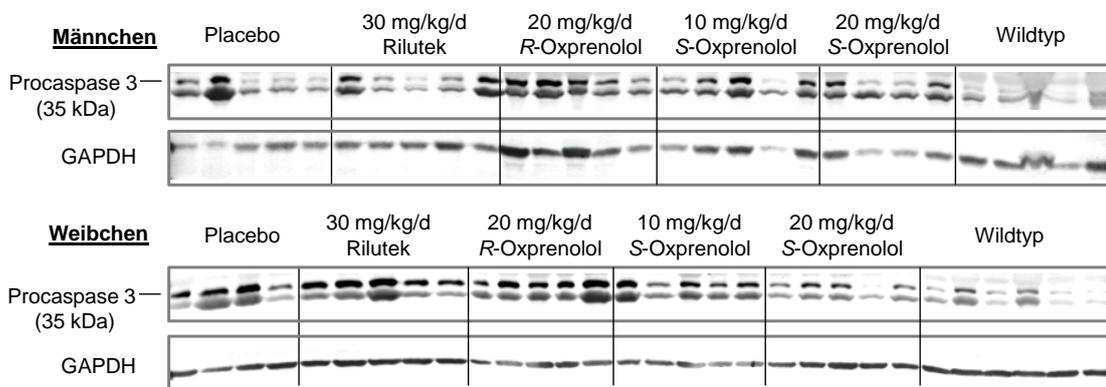


Abbildung 48: Behandlungseffekte auf den relativen Procaspase-3-Proteinlevel im GC in der Vergleichsstudie. Darstellung der Ergebnisse der relativen Procaspase 3/GAPDH Proteinexpression [au] (A) und den dazugehörigen Western Blots (B). Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. Placebo, **: $p < 0,01$ vs. Placebo.

3.3.4.8 Autophagie

Die relative Proteinexpression von Beclin-1 bei den WT-Tieren war, im Vergleich zu den Placebos, reduziert (Abbildung 49A). Der relative Beclin-1-Proteinlevel war bei den mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol-behandelten Tieren im Vergleich zu Placebotieren gesenkt. In der kombinierten Männchen und Weibchen Gruppe sowie bei den Männchen, einzeln betrachtet, führte die Behandlung mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol zu einer signifikanten Verminderung der Beclin-1-Proteinexpression (Abbildung 49A, Männchen und Weibchen: $p = 0,0101$, Männchen: $p = 0,0159$, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol vs. Placebo). Die Behandlung mit 30 mg/kg/d Rilutek und beiden Dosen *S*-Oxprenolol (10 oder 20 mg/kg/d) zeigte, im Vergleich zur Placebogruppe, weder bei den Männchen noch bei den Weibchen signifikante Unterschiede (Abbildung 49A). Die WT-Tiere zeigten, im Vergleich zu den Placebos, eine Reduktion der relativen Proteinexpression von ATG12 (Abbildung 49B). Die Behandlung mit Rilutek und den β -Blockern führte bei den Männchen und Weibchen, einzeln betrachtet, zu keinen signifikanten Veränderungen der relativen ATG12-Proteinexpression (Abbildung 49B).

Jedoch war in der kombinierten Männchen und Weibchen Gruppe zu beobachten, dass sich der ATG12-Proteinlevel durch die Behandlung mit 10 mg/kg/d S-Oxprenolol, versus den Placebos, signifikant erhöht hat (Abbildung 49B, $p=0,0279$). Die relative Proteinexpression des LC3-II/LC3-I-Verhältnisses in WT-Tieren war, im Vergleich zur Placebogruppe, runter reguliert (Abbildung 49C). Die Behandlung der Männchen und Weibchen mit Rilutek sowie R- oder S-Oxprenolol bewirkte hingegen, verglichen mit den Placebotieren, keine signifikante Änderung des LC3-II/LC3-I-Proteinverhältnisses, wobei jedoch durch die Behandlung mit beiden Dosen S-Oxprenolol die stärkste Reduktion erzeugt wurde (Abbildung 49C).

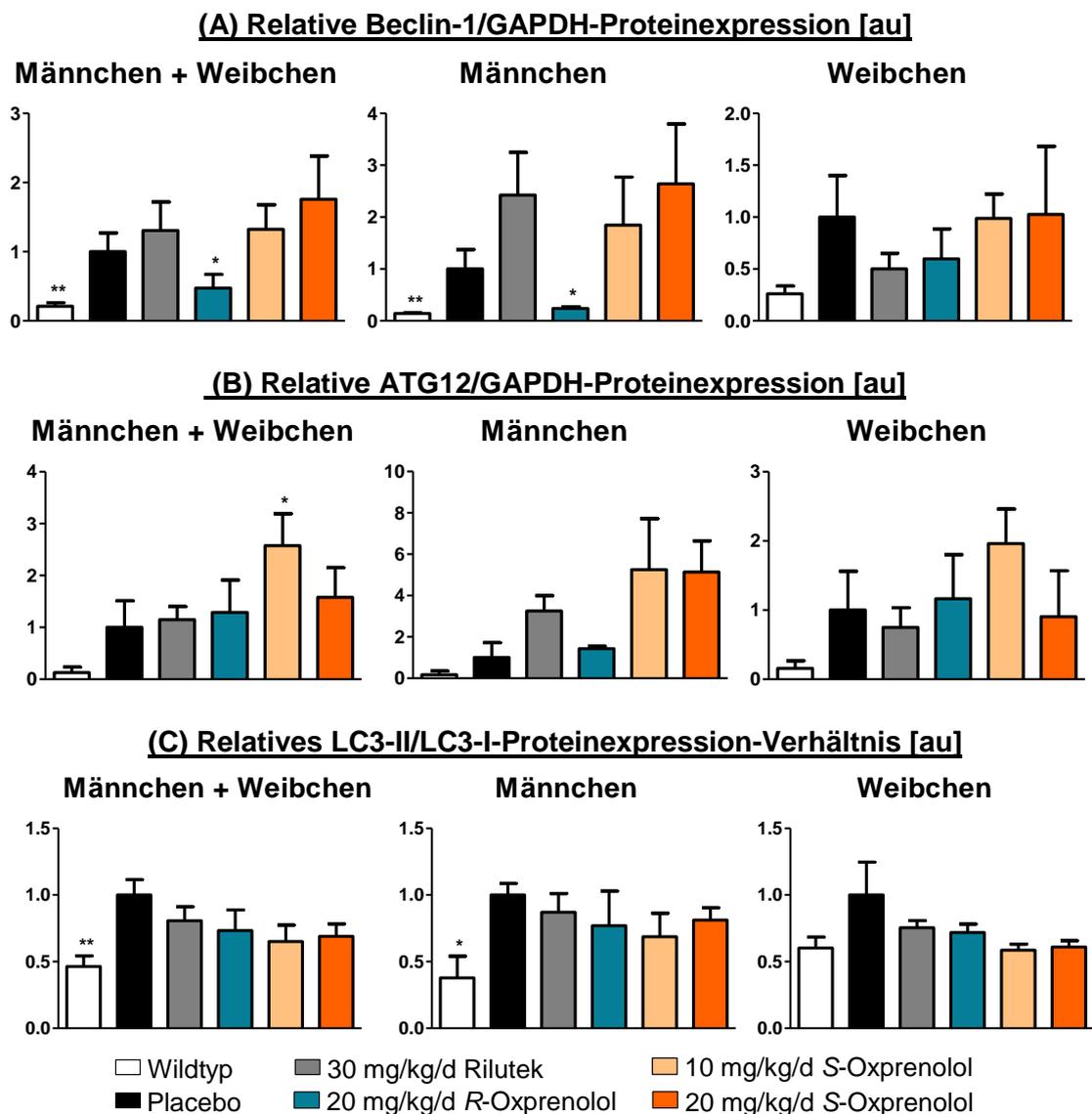


Abbildung 49: Behandlungseffekte auf die Autophagie im GC in der Vergleichsstudie. (A) relative Beclin-1/GAPDH Proteinexpression [au], (B) relative ATG12/GAPDH Proteinexpression [au] und (C) relatives LC3-II/LC3-I-Proteinexpression-Verhältnis [au]. Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. Placebo, **: $p < 0,01$ vs. Placebo

Abbildung 50 zeigt die Membranen, die für die Western Blot-Analyse zur Untersuchung der Behandlungseffekte von β -Blocker auf die Autophagie verwendet wurden.

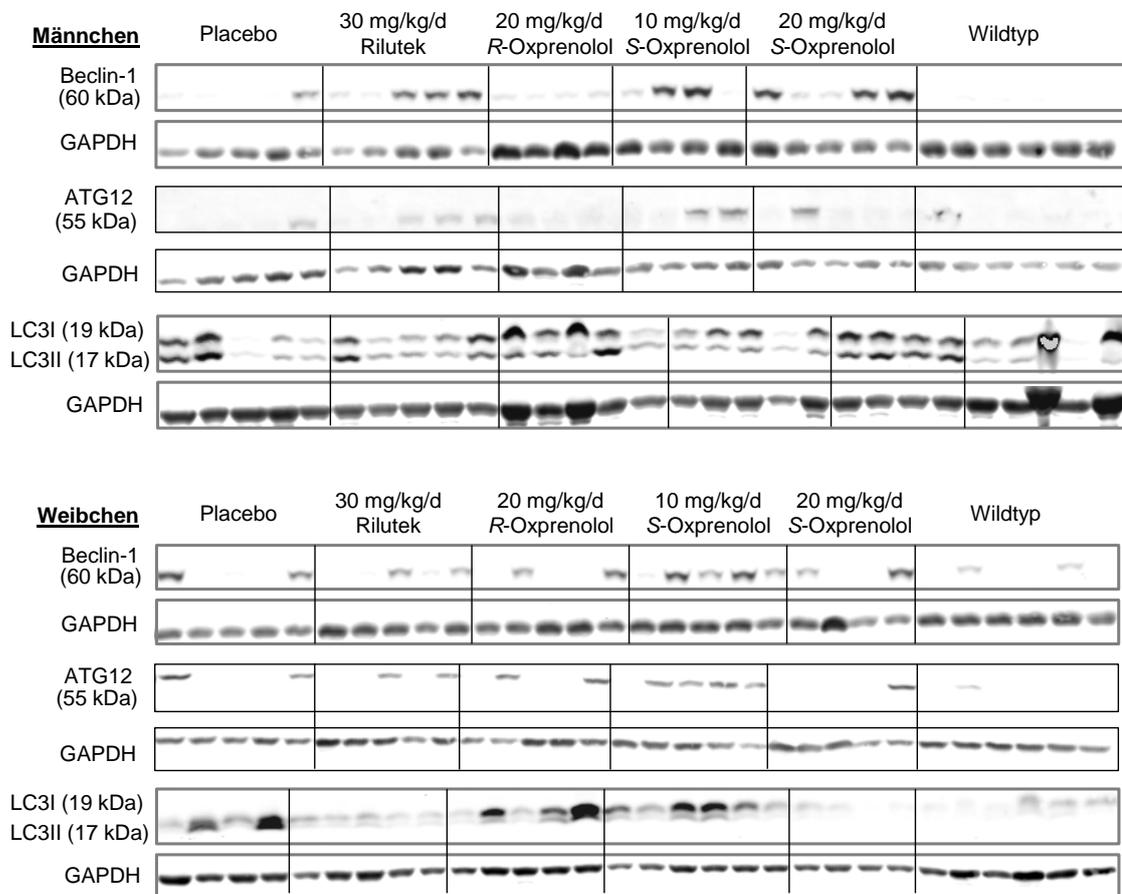


Abbildung 50: Western Blot-Abbildungen zur Analyse von Behandlungseffekten auf die Autophagie im GC in der Vergleichsstudie.

4 DISKUSSION

Über Kachexie bei ALS ist nicht viel bekannt. In dieser Arbeit wurde die Kachexie im G93A-SOD1-Mausmodell der ALS in Hinblick auf Parametern wie das Körpergewicht, die Körperzusammensetzung und der Skelettmuskulatur näher charakterisiert. Im Fokus stand aber vor allem die pharmakologische Behandlung der Kachexie bzw. ALS und deren Einfluss auf den Krankheitsverlauf und auf das Überleben der ALS-Mäuse. Des Weiteren wurde analysiert, ob die Pharmakotherapie eine Auswirkung auf die phänotypischen Merkmale, die Motoneuronendegeneration, auf die Inflammation sowie auf die Muskelatrophie, besitzt.

4.1 Phänotypische Charakterisierung der Kachexie im ALS-Mausmodell

Das transgene G93A-SOD1-Mausmodell ist das am weitesten verbreitete Tiermodell zur Erforschung der ALS. G93A-SOD1-Mäuse tragen eine mutierte Form des humanen SOD1-Gens und weisen dasselbe klinische und pathologische Krankheitsbild wie ALS-Patienten auf [31]. Aufgrund dessen eignet sich dieses ALS-Krankheitsmodell besonders gut für die Charakterisierung der Kachexie und für Untersuchungen der Effekte von pharmakologischen Interventionen.

4.1.1 Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Muskelgewichte

Eine Studie von Marin *et al.* ergab, dass 50 % der ALS-Patienten bereits zum Zeitpunkt der Diagnose mehr als 5 % und 36 % mehr als 10 % Körpergewicht verloren haben. Des Weiteren postuliert Marin *et al.*, dass ein Gewichtsverlust von mehr als 10 % das Sterberisiko um fast 50 % erhöhte [342]. Daher ist es umso wichtiger, nach Diagnosenstellung die Gewichtsabnahme zu reduzieren, um das Sterberisiko zu senken. Auch in dieser Arbeit konnte ein drastischer Gewichtsverlust bei den Mäusen festgestellt werden. Die ALS-Mäuse verloren bis zum finalen Zustand signifikant an Körpermasse. Das Körpergewicht reduzierte sich um 23,4 % bis zum Erreichen des Abbruchkriteriums. Die Tiere verloren bis zum finalen Zustand bis zu 24,5 % ihrer anfänglichen fettfreien Masse. Besonders erstaunlich war der Verlust der Fettmasse. Die Tiere nahmen bis zum Abbruch 65,8 % signifikant ihrer Ausgangsfettmasse ab. Die Analyse der Skelettmuskulatur ergab eine signifikante Abnahme des GC-, Soleus-, TA- und EDL-Muskels bis zum finalen Zustand. Das Gewicht des GC reduzierte sich bis zum finalen Zustand mit 48 % Massenverlust unter den Skelettmuskeln am stärksten. Diese Ergebnisse werden durch eine Studie von Capitanio *et al.*, in der die GC-Masse ebenfalls in der späten ALS-Phase um die Hälfte, verglichen mit einer gesunden Kontrolle, reduziert war, bestätigt [343]. Holzbaur *et al.* sowie Léger *et al.* beobachteten in ihren Studie ebenfalls einen signifikanten Verlust der GC- und TA-Masse in G93A-

SOD1-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen [210][344]. Die Tiere verloren bis zum Ende der Studie signifikant BAT-Masse und auch leicht an Herzgewicht. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Kachexie durch den rapiden Verlust an Körpergewicht, fettfreier Masse, insbesondere der Skelettmuskelmasse, und der Fettmasse im G93A-Mausmodell allgegenwärtig ist.

4.2 Effekte der Pharmakotherapie auf das Überleben und den Phänotyp

In einer Leberkrebsstudie wurden kachektische Ratten mit dem β -Blocker Bisoprolol behandelt und überlebten länger als Placebotiere [318]. In einer anderen Kachexie-assoziierten Studie mit Espindolol (S-Form vom β -Blocker Pindolol) konnte durch die Kombination einer pro-anabolen und anti-katabolen Wirkung das Körpergewicht, die fettfreie Masse und die funktionale Aktivität gesteigert und das Überleben verlängert werden [322][345]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kachexie bei der ALS stark ausgeprägt ist. Daher war es das Ziel durch die Verwendung von Propranolol und Oxprenolol den Krankheitsverlauf der ALS zu verzögern, die kachektischen Symptome im ALS-Mausmodell abzuschwächen sowie das Überleben zu verlängern. Propranolol und Oxprenolol sind sehr lipophil und können so die Blut-Hirn-Schranke passieren, was bei der Untersuchung einer neurodegenerativen Erkrankung, wie ALS, notwendig ist. Außerdem vereinen sie auch die gleichen Eigenschaften wie Espindolol. Durch die nicht-selektive β -Blockade von Propranolol und Oxprenolol sollten die sympathische Überaktivierung und der Proteinkatabolismus bei der ALS reduziert werden. Über die β 1-Blockade sollte der katabole/atrophische Signalweg und durch die partielle β 2-Rezeptor-Aktivierung die anabole Signalkaskade induziert werden. Hinzu kommt, dass Propranolol und Oxprenolol Antagonisten der Serotonin (5-Hydroxytryptamin)-Typ 1A-Rezeptoren (5-HT_{1A}) sind, weshalb es durch die 5-HT_{1A}-Blockade zu einer reduzierten Thermogenese kommen kann [346] und so zur Energieerhaltung beiträgt.

4.2.1 ALS-Progression und Überleben

Placebotiere erreichten im Durchschnitt 24 Tage nach Erstsymptomatik Stufe 2 der Krankheit. Durch die Behandlung mit beiden Dosen R- und S-Oxprenolol konnte der Krankheitszustand von Stufe 1 zu Stufe 2 signifikant verzögert werden. Rilutek und Propranolol hingegen zeigten keine Verzögerung des Krankheitszustandes von Stufe 1 zu Stufe 2. Der Krankheitsverlauf von Stufe 1 zu Stufe 3 der Placebotiere dauerte bei den Weibchen 40 Tage. Bei den Männchen allerdings dauerte der Übergang von Stufe 1 zu Stufe 3 nur 32 Tage. Patel *et al.* konnten ebenfalls einen früheren Beginn der ersten ALS-Symptome bei den Männchen als bei den Weibchen feststellen [136]. In der Gesamtheit konnte keine signifikante Verlangsamung des Krankheitsverlaufes der Tiere von Stufe 1 zu Stufe 3 durch Rilutek, genau so wie von Stufe 1 zu Stufe 2, erzielt

werden. Diese Ergebnisse werden durch eine Studie von Gurney *et al.* bestätigt [347]. Die Behandlung mit Propranolol verzögerte weder den Krankheitsverlauf der Männchen noch der Weibchen. Die höheren Dosen *R*- und *S*-Oxprenolol (20 mg/kg/d) hatten mit 19 Tagen Verzögerung von Stufe 1 zu Stufe 3, den positivsten Einfluss auf die Krankheitsentwicklung bei den Männchen. Bei den Weibchen erwies sich die höhere Dosis des *S*-Oxprenolols mit 12 Tagen Verlangsamung als die einflussreichste Substanz. Die scheinbar unterschiedliche Progression der Weibchen und Männchen könnte aufgrund des höheren endogenen Östrogengehaltes in den Weibchen zu erklären sein [348]. In anderen neurodegenerativen Erkrankungen konnte ebenfalls eine positive Wirkung des Östrogens festgestellt werden [349]. Die positiven Effekte der Behandlung mit *R*- und *S*-Oxprenolol, spiegelte sich im Überleben der Tiere wider. *R*- und *S*-Oxprenolol steigerten das Überleben der männlichen Tiere signifikant. Bei den Weibchen hatte die Behandlung mit der höheren Dosis *S*-Oxprenolol, im Vergleich zu Placebotieren, den größten lebensverlängernden Einfluss. In der Gesamtheit betrachtet, wurde das Überleben der Tiere durch die Behandlung mit den höheren Dosen *R*- und *S*-Oxprenolol (20 mg/kg/d) am stärksten gesteigert. Die Behandlung mit beiden Dosen *S*-Oxprenolol führte zum größten lebensverlängernden Effekt nach Geburt der Tiere. Propranolol und Rilutek steigerten das Überleben der Tiere nicht. Im Gegensatz dazu, zeigte eine Studie von Gurney *et al.* in G93A-SOD1-Mäusen, dass Rilutek das Überleben verlängern konnte [347]. In ALS-Patienten konnte eine in etwa gleiche Verbesserung erzielt werden [87]. Allerdings diskutierten Miller *et al.* bereits, ob die Behandlung mit Rilutek beim Menschen überhaupt signifikante Verbesserungen hervorruft [350]. Darin wird auch die Veröffentlichung von Bensimon *et al.* erwähnt, in der die Behandlung mit Rilutek das Überleben nicht verlängerte [351]. Propranolol hatte im Gegensatz zu Oxprenolol keinen Einfluss auf die ALS-Progression und das Überleben der Tiere. Ein möglicher Grund dafür könnte die vorhandene ISA beim Oxprenolol sein. Dadurch hat Oxprenolol eine partielle agonistische Aktivität am β -AR. Oxprenolol hat somit einen großen Vorteil. Es vereint die Eigenschaften eines β -Blockers, welche die sympathische Überaktivierung bei der ALS reduziert und den Proteinanabolismus durch die partielle Aktivierung der β -AR induziert. Interessanterweise wurden bisher häufig β -Blocker-Agonisten als putative Therapien bei Kachexie und ALS eingesetzt. Kürzlich ist erst eine Veröffentlichung von Bartus *et al.* zu den Vorteilen der β -AR Agonisten bei der ALS erschienen [352]. β -Agonisten verbessern die Skelettmuskulatur in Struktur und Funktion und erhöhen signifikant die Muskelmasse und -stärke durch die Stimulation der Proteinsynthese über den Akt-Signalweg und der Hemmung der Proteindegradation [353]. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Untersuchungen ebenfalls festgestellt, dass die

Enantiomere des Oxprenolols (*R*- und *S*-Form) noch einen positiveren Einfluss, als das Razemat an sich, auf die Verzögerung des Krankheitsverlaufes und das Überleben besaßen. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die Enantiomere eines Stoffes anders verhalten als das Razemat. Das Razemat Oxprenolol besitzt ein chirales Zentrum und ist optisch nicht aktiv. In einem Razemat sind die Enantiomere 1:1 vorhanden. *R*-Oxprenolol und *S*-Oxprenolol verhalten sich spiegelbildlich zueinander und sind optisch aktiv, weshalb sie auch unterschieden und getrennt werden können. *R*-Oxprenolol dreht die Polarisationssebene des linear polarisierten Lichtes im Uhrzeigersinn (rechtsdrehend, +) und *S*-Oxprenolol gegen den Uhrzeigersinn (linksdrehend, -). Im Razemat wird die Drehung des polarisierten Lichtes wieder aufgehoben, weshalb ein Razemat optisch nicht aktiv ist. Viele Enzymreaktionen und Rezeptoren sind auf ein Enantiomer spezialisiert. Daraus ergeben sich unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten, Plasmaproteinbindungen und damit auch eine andere orale Bioverfügbarkeit, was zu einer unterschiedlichen Wirksamkeit führt [354]. Interessanterweise ist die linksdrehende *S*-Form die aktivere von beiden Formen, weil sie eine Hydroxylgruppe in *D*-Konfiguration besitzt. *S*-Oxprenolol hat eine 10-35-fach höhere Aktivität als *R*-Oxprenolol und bindet den β -AR stärker und blockiert dadurch die β -AR effektiver. Des Weiteren wurde publiziert, dass *S*-Oxprenolol im Plasma 3-fach höher konzentriert ist als die *R*-Form und auch 4-fach weniger aus dem Plasma befreit wird [355]. Auch in dieser Arbeit scheint die *S*-Form effektiver zu wirken.

4.2.2 Körpergewicht, die Körperzusammensetzung und die Muskelgewichte

Wie unter 4.1.1 beschrieben, kommt es zu einem erheblichen Verlust an Körpergewicht, Fett und fettfreier Masse. Die Behandlung der Tiere mit Rilutek und den β -Blockern sollte diese negativen Effekte kompensieren. Für die Untersuchung des Behandlungseinflusses wurden das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung in der Überlebens- sowie in der Vergleichsstudie ermittelt. Die Placebotiere nahmen durchschnittlich von Anfang bis Ende der Überlebensstudie 24 % ihres Ausgangsgewichtes ab. Die Behandlung mit Rilutek, Propranolol und Oxprenolol (Razemat oder Enantiomer) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Veränderung des Körpergewichtes am Ende der ALS. Allerdings wurde beobachtet, dass die Behandlung mit 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol den Verlust an Körpermasse pro Tag signifikant reduzierte. Die Tiere verloren 64 % Ihrer Fettmasse zu Beginn. Der Verlust an Fettmasse konnte nicht durch die Behandlung mit den β -Blockern Propranolol und Oxprenolol (Razemat und Enantiomere) abgeschwächt werden. Allerdings konnte eine Zunahme des BAT durch die Behandlung mit Rilutek beobachtet werden. Demnach scheint Rilutek einen positiven Effekt auf den Verlust an BAT zu besitzen. Dieser Effekt könnte aber auch auf die schon am Anfang höhere BAT-Masse der Tiere

zurückzuführen sein. Die Placebotiere verloren 23 % ihrer fettfreien Masse am Anfang. Die Behandlung mit 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol hatte den positivsten Einfluss auf den Verlust an fettfreier Masse, weil die Tiere bis zum Ende der Studie, als auch pro Tag, weniger fettfreie Masse als die Placebotiere verloren. Die Behandlung der Tiere mit Rilutek, Propranolol und Oxprenolol (Razemat und Enatiomere) beeinflusste die Skelettmuskelmasse des GC, TA, Soleus und EDL nicht. Allerdings reduzierte die Behandlung mit *R*-Oxprenolol die Soleus- und EDL-Masse zusätzlich. Das Herzgewicht blieb in der Gesamtheit unverändert. Jedoch war durch die Behandlung mit 10 mg/kg/d *R*-Oxprenolol die Herzmasse bei den Männchen signifikant herabgesetzt, wohingegen die Weibchen signifikant mehr Herzmasse als die Placebos aufwiesen. Es ist bekannt, dass bei der ALS die kardiale autonome Kontrolle durch eine parasymphatische Dysfunktion und einer sympathischen Prädominanz beeinträchtigt ist [356]. Womöglich kann diese Beeinträchtigung durch 10 mg/kg/d *R*-Oxprenolol verbessert werden. Letztendlich beweisen diese Ergebnisse aber lediglich, dass die Krankheit meist auf die gleiche Art und Weise endet. Erreichen die Tiere ihren Endpunkt weisen sie ähnliche Werte des Verlustes an Körpergewicht und Körperzusammensetzung auf. Der durchschnittliche Verlust pro Tag war jedoch durch die Behandlung mit *S*-Oxprenolol signifikant reduziert und ermöglicht so eventuell eine bessere Lebensqualität. Dennoch war es wichtig diese Parameter ebenfalls zu einem einheitlichen Zeitpunkt zu ermitteln (Vergleichsstudie).

Placebotiere in der Vergleichsstudie verloren im Durchschnitt 10 % ihres Ausgangskörpergewichtes, 22 % ihrer Fettmasse und 12 % ihrer fettfreien Masse. Der klinische Phänotyp war bei den Weibchen in dieser Studie etwas schwerer als bei den Männchen ausgeprägt, was interessant ist, weil die Männchen in der vorliegenden Arbeit, als auch schon in anderen SOD1-Mausstudien, eine kürzere Lebensspanne zeigten [357][332]. Die Gewichte des GC, TA, Soleus, EDL und des Herzens waren in gesunden WT-Tieren signifikant höher als bei den kranken Placebotieren. Dies bestätigt nochmal die starke Muskelatrophie bei den G93A-SOD1-Mäusen aus der Verlaufsstudie. Die Behandlung der Männchen mit Rilutek und 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol führte zu einer Reduktion, allerdings zu keiner signifikanten, des Verlustes an Körpergewicht und Fettmasse. Bei der Skelettmuskulatur sowie bei der Herzmasse zeigten sich, im Gegensatz zu Rilutek, positive Trends durch die Behandlung mit *R*- und *S*-Oxprenolol. Bei den Weibchen wurden signifikant positivere Behandlungseffekte verzeichnet. Interessanterweise verloren die mit beiden Dosen *S*-Oxprenolol-behandelten Weibchen kein Körpergewicht, sondern nahmen signifikant 1 % ihres Anfangs-Körpergewichtes zu. Durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und

beiden Dosen S-Oxprenolol nahmen die Weibchen ebenfalls weniger Fett- und fettfreie Masse ab. In einer Studie von Patel *et al.* konnte gezeigt werden, dass ein erniedrigtes Körpergewicht zu einer schnelleren Erstsymptomatik und zu einer verkürzten Lebensdauer bei G93A-SOD1-Mäusen führen kann [136]. Durch R- und S-Oxprenolol waren die Tage bis zur Erstsymptomatik und das Überleben verlängert. Womöglich ist dieser positive Einfluss aufgrund der besseren Körperbeschaffenheit zurückzuführen. Außerdem könnte die Behandlung den erhöhten Hypermetabolismus, der bei 50-70 % der ALS-Patienten vorkommt [123], gesenkt haben. Außerdem ist bekannt, dass es in kachektischen Tumorpatienten zu einer erhöhten Lipolyse durch eine vermehrte Expression von β_1 -AR in Adipozyten [358] und durch eine ebenfalls gesteigerte β_1 -AR-Aktivierung durch Katecholaminen [359] kommt. Hryniewicz *et al.* bewiesen, dass eine Behandlung mit β -Blockern die Katecholamin-Konzentration in kachektischen Patienten senken konnte [360]. Der reduzierte Verlust der Fettmasse und der fettfreien Masse durch die Behandlung mit R- und S-Oxprenolol könnte also mit einer verringerten Lipolyse erklärt werden. Die Weibchen verloren durch die Behandlung mit den höheren Dosen R- und S-Oxprenolol (20 mg/kg/d) weniger GC- und TA-Gewicht. Es zeigte sich ein positiver Trend zum Gewicht des Soleus, des EDL und des Herzens durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d S-Oxprenolol. Es scheint also, als ob die Behandlung mit R- und S-Oxprenolol die Muskelatrophie verlangsamt. Die Muskel-Degeneration nimmt auch einen wesentlichen Einfluss auf die Funktion der Knochen, denn Skelettmuskeln spielen eine wichtige Rolle beim Knochenumbau [361][362]. Daher hat die Behandlung wahrscheinlich auch einen indirekten Einfluss auf den Knochenbau und die Stabilität des Skeletts. Im Herzen könnte die oben erwähnte sympathische Prädominanz, die Pavlovic *et al.* bei ALS-Patienten beobachten konnten [356], durch R- und S-Oxprenolol gesenkt worden sein.

4.2.3 Einfluss auf die Anzahl der Motoneuronen

WT-Tiere wiesen im primären Motorcortex als auch im lumbalen Rückenmark signifikant mehr Motoneuronen als Placebotiere auf. Durch die Behandlung mit Rilutek und 20 mg/kg/d R-Oxprenolol sowie beiden Dosen S-Oxprenolol war die Anzahl der Motoneuronen, im Vergleich zu Placebos, im primären Motorcortex als auch im lumbalen Rückenmark, signifikant erhöht. Die höhere Anzahl an Motoneuronen bewirkt vermutlich auch die lebensverlängernde Wirkung von R- und S-Oxprenolol. Bisher gibt es noch nicht viele Behandlungsmöglichkeiten, die eine signifikante Erhaltung der oberen und unteren Motoneuronenfunktion nach sich ziehen und somit den Krankheitsausbruch verzögern und das Überleben verlängern. Mancuso *et al.* haben 2014 erstmals eine solche Behandlungsmöglichkeit mit Resveratrol vorgestellt [363]. Interessanterweise sind β_2 -AR weit verbreitet auf Neuronen im Gehirn und im

Rückenmark exprimiert [364][365], auch in Gehirnregionen, die bei der ALS betroffen sind [366]. Es könnte also sein, dass die Behandlung direkt auf die Motoneuronen gewirkt hat. Deshalb wäre der Einsatz von *R*- und *S*-Oxprenolol auch bei anderen Motoneuronen-Krankheiten, wie bei der spastischen Spinalparalyse oder der spinalen Muskelatrophie sowie bei der Poliomyelitis (Kinderlähmung), interessant. Die höhere Anzahl an Motoneuronen hat vermutlich auch einen direkten Einfluss auf die Muskelatrophie. Es ist bekannt, dass die Degeneration von Motoneuronen nicht nur auf die Neuron zu Muskel-Signalisierung limitiert ist, sondern auch einen Einfluss auf die Muskel zu Neuron-Signalisierung hat, die für das axonale Wachstum und für die Aufrechterhaltung der neuromuskulären Synapsen wichtig ist [367]. Demnach gibt es eine gegenseitige Abhängigkeit, die durch die Behandlung vermutlich aufrechterhalten bzw. verbessert wurde.

4.2.4 Effekt auf die Inflammation

Nicht nur die Motoneuronen, sondern auch nicht-neuronale Zellen wie die Gliazellen, spielen bei der ALS eine wichtige Rolle. Eine erhöhte Anzahl an Makrogliazellen (Astrozyten), und Mikrogliazellen stehen im Verdacht ALS zu induzieren. Bis heute ist zwar noch nicht ganz klar, ob die erhöhte Anzahl eine Ursache oder eine Konsequenz der Motoneuronendegeneration ist. Astrozyten und Mikrogliazellen setzen Zytokine frei, die eine Inflammationsreaktion auslösen können. Interessanterweise besitzen Astrozyten [368][369] und Mikrogliazellen [370] auch β -AR, weshalb die β -Blocker-Behandlung einen direkten Einfluss auf diese nehmen könnte. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Dichte von β_2 -AR in reaktiven Astrozyten im Rückenmark von ALS-Patienten stark erhöht ist [371]. Durch die Blockade der β_2 -AR in Astrozyten und Mikrogliazellen kommt es vielleicht zu einer Beeinflussung der Inflammation. In dieser Arbeit besaßen kranke Placebotiere signifikant mehr Astrozyten und Mikrogliazellen im lumbalen Rückenmark als gesunde WT-Tiere. Diese Ergebnisse werden von Mancuso *et al.* zum Teil bestätigt. Die Mikroglia-Immunoreaktivität war bei Mancuso *et al.* im Gegensatz zur Astrozyten-Immunoreaktivität im lumbalen Rückenmark von G93A-SOD1-Mäusen, verglichen mit WT-Tieren, signifikant erhöht [363]. Männchen und Weibchen, die mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol behandelt wurden, hatten signifikant weniger Astrozyten als die Placebotiere. Durch die reduzierte Anzahl an GFAP-positiven Astrozyten, könnte man vermuten, dass vermehrt gesunde Astrozyten vorhanden sind. Interessanterweise konnte Lepore *et al.* zeigen, dass eine Anreicherung mit gesunden Astrozyten im Rückenmark von G93A-SOD1-Mäusen die Motoneuronendegeneration abschwächt und das Überleben steigert [372]. Die Anzahl der Mikrogliazellen war bei den Männchen und Weibchen durch die Behandlung mit 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol, im Vergleich zu Placebotieren, signifikant

reduziert. Eine Studie von Van den Bosch *et al.* konnte darlegen, dass Minocyclin, welches die Mikroglia-Aktivierung reduziert, die ALS-Progression verzögerte und das Überleben in G93A-SOD1-Tieren verlängerte [373]. Auch der Austausch mit gesunden Wildtyp-Mikrogliazellen verlangsamte die ALS-Progression im G93A-SOD1-Mausmodell [374]. Die erhaltende geringere Anzahl an Astrozyten und Mikrogliazellen, durch die Behandlung mit *R*- und *S*-Oxprenolol, hat dementsprechend einen positiven Einfluss auf die Motoneuronendegeneration und korreliert positiv mit dem Krankheitsverlauf und dem Überleben der G93A-SOD1-Mäuse, wie in dieser Arbeit gezeigt. Darüber hinaus könnte sich die Behandlung mit *R*- und *S*-Oxprenolol ebenfalls positiv auf die Neuroinflammation bei Alzheimer [150] und Parkinson [375] auswirken. Des Weiteren wurde abgeklärt, ob die Anzahl an Astrozyten und Mikrogliazellen eventuell einen Einfluss auf die Zytokin-Konzentration im Blut besitzt. Die Plasma-Konzentrationen von IL-1 β , IL-2, IL-6 und TNF- α waren bei kranken Placebotieren, im Vergleich zu gesunden WT-Tieren, nicht signifikant erhöht. In einer Studie von Jeyachandran *et al.* wurde allerdings berichtet, dass diese Zytokine im G93A-SOD1-Mausmodell ansteigen [376]. Darin wird aber auch erwähnt, dass die Inflammation in der frühen Phase der ALS eine entscheidendere Rolle als in der späten Phase besitzt. Da die Untersuchungen zu den Behandlungseffekten auf die Inflammation in der späten Phase der ALS durchgeführt wurden, könnte die Inflammation zu diesem Zeitpunkt also eine nicht mehr so relevante Rolle gespielt haben. Dies wird durch eine Studie von Ehrhart *et al.* mit ALS-Patienten, und der gleichen methodischen Vorgehensweise, wie in dieser Arbeit, bestätigt. Hier waren die IL-1 β , IL-2, IL-6 und TNF- α -Konzentrationen im Blutplasma, im Vergleich zur Kontrollgruppe, auch nicht in der späten Phase signifikant erhöht [377]. Allerdings war die IL-10 und IFN- γ -Konzentration der Placebotiere, verglichen mit WT-Tieren, signifikant erhöht. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass IL-10 und IFN- γ vermehrt bei der ALS freigesetzt wurden. In der oben genannten Studie von Jeyachandran *et al.* war die IL-10-Konzentration, im Vergleich zur WT-Gruppe, ebenfalls signifikant erhöht [376]. IL-10 ist bekannt als ein anti-inflammatorisches Zytokin [378]. In einem 2013 veröffentlichten Artikel von Mühl wird allerdings auch auf das pro-inflammatorische Potential von IL-10 hingewiesen [379]. In einer Studie von Lauw *et al.* konnte beobachtet werden, dass durch die Erhöhung der IL-10 Konzentration auch die IFN- γ -Konzentration potenziert wurde [380]. Somit ist auch klar, dass eine erhöhte IL-10-Konzentration, wie in dieser Arbeit bei den Placebotieren zusehen, nicht unbedingt eine anti-inflammatorische Wirkung besitzen muss. Es könnte also sein, dass die erhöhte IL-10-Konzentration die erhöhte IFN- γ -Konzentration in dieser Arbeit bedingt. Dennoch hat die Behandlung mit Rilutek, 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol und *S*-Oxprenolol (10 oder 20 mg/kg/d) bei den

Männchen kaum zu einer Reduzierung der gemessenen Zytokine, im Vergleich zu den Placebos, geführt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass es durch die Behandlung der Weibchen mit 10 als auch 20 mg/kg/d S-Oxprenolol zu einem, teilweise auch signifikanten, Abstieg der Zytokine im Blutplasma gekommen ist. Die Anwendung von S-Oxprenolol scheint somit die Inflammation bei den Weibchen positiv zu beeinflussen. Allerdings waren die Werte während der Analyse sehr gering, weshalb sie extrapoliert wurden. Diese niedrigen Messwerte waren bei Ehrhart *et al.* aber auch zu beobachten [377]. Um genauere Ergebnisse zu erzielen, wäre es zusätzlich noch sinnvoll die Zytokin-Konzentration in spezifischen Geweben, wie z.B. im lumbalen Rückenmark, zu messen. Hensley *et al.* machten solche Untersuchungen und konnten eine viel höhere Zytokin-Konzentration feststellen, die auch in den G93A-SOD1-Mäusen, verglichen mit nicht-transgenen Mäusen, für IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α und IFN- γ signifikant erhöht war [171]. Der durch die Behandlung mit S-Oxprenolol gesenkte Inflamationsgrad, im Speziellen der signifikant reduzierte IL-6-Level, bei den Weibchen, könnte somit tatsächlich einen Einfluss auf die Kachexie und die Muskelatrophie haben. Es konnte auch bereits durch Costelli *et al.* gezeigt werden, dass in kachektischen Ratten durch Blocken von IL-6, der Abbau der Muskelmasse verhindert werden konnte [381].

4.3 Einfluss der pharmakologischen Behandlung auf die Muskelatrophie

Muskelatrophie ist ein Kennzeichen der ALS. Die Anzahl der Motoneuronen, der Astrozyten und Mikrogliazellen sowie die Inflammation können sich auf die Muskelatrophie auswirken. Hierbei werden katabole Mechanismen induziert und anabole Wege inhibiert. In dieser Arbeit wurden Proteinstoffwechselwege im GC-Muskel, die bei der Atrophie als auch bei Kachexie eine Rolle zu spielen scheinen, näher untersucht. Darüber hinaus ist bekannt, dass β -AR in der Skelettmuskulatur signifikant vertreten sind. Die β_2 -AR sind dabei die vorherrschenden Rezeptoren im Skelettmuskel, obwohl auch 7-10 % β_1 -AR vorhanden sind [382][383]. Es könnte also sein, dass die β -Blocker-Behandlung auch einen direkten Einfluss auf die Skelettmuskulatur bzw. auf die Muskelatrophie durch die β -Blockade (Reduktion des Proteinkatabolismus) und die partielle Aktivierung (Aktivierung des Proteinanabolismus) besitzt.

4.3.1 Auswirkung der Behandlung auf die Muskelfaser-Verteilung

Es tritt eine deutliche Muskelatrophie im GC-Skelettmuskel im G93A-SOD1-Mausmodell auf. Dies konnte bereits Holzbauer *et al.* im GC von G93A-SOD1-Mäusen nachweisen [210]. WT-Tiere wiesen einen signifikant größeren Muskelfaserquerschnitt und einen signifikant höheren Anteil an großen GC-Muskelfasern als Placebotiere, in

der vorliegenden Arbeit, auf. Interessanterweise beeinflusste die Anwendung mit Rilutek, verglichen mit Placebotieren, in keinem Maße den Anteil an großen Muskelfasern. Allerdings bewirkte die Behandlung der Männchen mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol durchschnittlich größere Muskelfasern und es zeigte sich eine positive Verschiebung zum höheren Anteil an großen GC-Muskelfasern. Bei den weiblichen Tieren führte die Behandlung mit den höheren Dosen *R*- und *S*-Oxprenolol, im Vergleich zu Placebotieren, zu einem größeren Muskelfaser-Querschnitt und einem höheren Anteil an großen GC-Muskelfasern. Demnach scheint die Behandlung mit den höheren Dosen der Oxprenolol-Enantiomere die Verteilung der GC-Muskelfasern positiv zu beeinflussen und die Muskelatrophie abzuschwächen. Die unterschiedliche Wirkungsweise bei den Männchen und Weibchen könnte auf die verschiedenen pharmakokinetischen Eigenschaften der *R*- und *S*-Form beruhen. Denn die Stereoselektivität kann auch durch das Geschlecht beeinflusst werden [354].

4.3.2 Behandlungseffekte auf katabole und anabole Mechanismen

Eine mögliche Erklärung für die Verringerung der Muskelatrophie im GC könnte auch der Myostatin-Signalweg sein. Zunächst konnte festgestellt werden, dass die relative Myostatin-Proteinexpression im GC von Placebotieren, im Vergleich zu gesunden Tieren, signifikant angestiegen ist. Durch die Behandlung der Männchen mit *R*- und *S*-Oxprenolol kam es zu einer signifikanten Reduktion des inaktiven Myostatin-Levels, verglichen mit Placebos, aber zu keiner Veränderungen des aktiven Myostatins. Die Behandlung der Männchen zeigte weder einen signifikanten Einfluss auf Follistatin, als Myostatin-Inhibitor, noch auf ActRIIB, der als Bindungsrezeptor für Myostatin agiert. Dennoch lag phosphoryliertes SMAD2/3 (pSMAD2/3) runterreguliert vor, was eine Inhibition des Akt-Signalweges und somit eine verminderte Atrophie auslösen kann. Vermutlich wurde SMAD2/3 durch SMAD7 phosphoryliert und nicht direkt durch die Myostatin-Signalkaskade über ActRIIB. Myostatin kann nämlich auch die Expression von SMAD7 induzieren, was eine Phosphorylierung von SMAD2 verursachen kann [230]. Die mikroskopische Analyse der Muskelatrophie bei den Weibchen korreliert positiv mit den Ergebnissen aus der Untersuchung der Myostatin-Signalkaskade. Die Expression von inaktivem sowie aktivem Myostatin reduzierte sich signifikant, aufgrund der Behandlung mit *S*-Oxprenolol. Auch die Verwendung von *R*-Oxprenolol verursachte eine verminderte Expression von Myostatin, jedoch keine signifikante. Im tumorinduzierten Yoshida Hepatoma Ratten-Modell konnte auch durch die *S*-Form des β -Blockers Pindolol (Espindolol) eine Reduktion des inaktiven sowie aktiven Myostatin-Proteinlevels im GC erzielt werden [384]. Die gesenkte Myostatin-Proteinexpression bei den Weibchen könnte dazu beigetragen haben, die GC-Muskelmasse, wie in dieser Arbeit gezeigt, zu erhöhen. Interessanterweise zeigte die Studie von Holzbaur *et al.*

auch eine Verlangsamung der Muskelatrophie durch eine Myostatin-Inhibition [210]. McPherron *et al.* konnten zusätzlich zeigen, dass die Inhibition von Myostatin zu einer Muskel-Hypertrophy führen kann [385]. Der verminderte ActRIIB-Proteinlevel nach Behandlung mit *R*- und *S*-Oxprenolol resultierte vermutlich aufgrund der reduzierten Myostatin-Expression. Die Behandlung der Weibchen scheint aber keinen Effekt auf die Follistatin-Expression zu besitzen. Jedoch erhöhte sich die phosphorylierte Menge an SMAD2/3 signifikant bei der Anwendung von *R*-Oxprenolol, was eine gesteigerte Atrophie nach sich ziehen könnte. *S*-Oxprenolol scheint, im Vergleich zu Placebotieren, keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von SMAD2/3 zu haben. Allerdings konnte auch keine Änderung von Placebotieren zu WT-Tieren festgestellt werden, weshalb es schwer ist eine eindeutige Aussage über den Einfluss der Behandlung zu treffen.

Die Proteinexpression des Atrophiemarkers MuRF1 war in Placebo-behandelten Männchen gegenüber gesunden Tieren signifikant erhöht, was eine gesteigerte Muskelatrophie impliziert. Die Behandlung der männlichen Tiere mit beiden Dosen *S*-Oxprenolol bewirkte eine signifikante Reduktion der MuRF1-Expression, was vermutlich zu einer reduzierten Induktion der Muskelatrophie führte. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden und kranken Weibchen bezüglich der MuRF1-Expression. Rilutek besitzt weder in Weibchen noch in Männchen einen signifikanten Einfluss auf die MuRF1-Expression. Die Expressions-Analyse eines anderen Atrophie-Auslösers, MAFbx, ergab bei den männlichen Tieren keine Veränderungen zwischen gesunden WT-Tieren und kranken G93A-SOD1-Mäusen. Allerdings erhöht die Behandlung mit 20 mg/kg/d *R*-Oxprenolol signifikant die MAFbx-Expression im Vergleich zu Placebotieren. Interessanterweise konnte aber bei den weiblichen Tieren eine signifikante Induktion der MAFbx-Proteinexpression im GC von kranken G93A-SOD1-Mäusen gegenüber gesunden Tieren festgestellt werden. Die Behandlung mit 20 mg/kg/d *S*-Oxprenolol beeinflusste die MAFbx-Expression durch eine Reduktion am stärksten. Rilutek besitzt keinen Einfluss auf die MAFbx-Expression. Es scheint so, als ob bei den Männchen die MuRF1- und bei den Weibchen die MAFbx-Regulierung eine entscheidene Rolle spielt und die *S*-Oxprenolol-Behandlung den positivsten Einfluss auf die Muskelatrophie der kranken Tiere hat. Allerdings waren die MAFbx- und MuRF1-Expressionslevel bei ALS-Patienten-Studien ebenfalls mal erhöht und mal erniedrigt [344][386]. In der vorliegenden Arbeit ist die MAFbx-Proteinexpression, in der Gesamtheit betrachtet, durch die Behandlung unverändert geblieben. Vermutlich kommt das durch die ebenfalls unveränderte FoxO3a-Expression zustande (siehe unten). Denn in der Literatur ist beschrieben, dass FoxO3a, vorrangig die Expression von MAFbx im

Muskel auslösen kann [230]. Darüber hinaus gibt es auch noch andere E3-Ligasen, die die Atrophie induzieren können wie z.B. TRIM32 [263], FBXO40 [264], TRAF6 [266], MUSA1 [267] oder wie kürzlich erst entdeckt, Fbxo31 [268].

Weiterhin war es interessant herauszufinden, warum MuRF1 bei den Männchen und MAFbx bei den Weibchen vorrangig einen Effekt zeigte und durch die Behandlung beeinflusst wurden. Dafür wurde der Akt-Signalweg näher untersucht. Des Weiteren ist auch bekannt, dass Myostatin u.a. die Phosphorylierung von Akt reguliert und Akt wiederum einen Einfluss auf FoxO ausüben und über diesen Weg den Anabolismus der Skelettmuskulatur beeinflussen kann. Das heißt, die Phosphorylierung und damit auch die Aktivierung von Akt verursacht die Hemmung der FoxO-vermittelten Transkription von Atrogenen. Die Phosphorylierung von Akt am Threonin (Thr) 308 nahm jedoch bei den WT-Tieren, verglichen mit Placebos, leicht ab bzw. stieg nicht signifikant an. Die Akt-Phosphorylierung am Serin (Ser) 473 hingegen war bei den WT-Tieren, im Vergleich zu den Placebotieren, signifikant erhöht. Dobrowolny *et al.* konnten ebenfalls eine Erhöhung der Akt-Phosphorylierung an Ser473 spezifisch in Muskeln bei WT-Mäusen im Gegensatz zu G93A-SOD1-Mäusen feststellen [244]. Für eine maximale Aktivierung von Akt ist allerdings die Phosphorylierung an beiden Aminosäureresten erforderlich. Aufgrund der Resultate ist demnach zu vermuten, dass es zu keiner erheblichen Aktivierung von Akt gekommen ist, was die Ergebnisse der verwendeten Behandlungsgruppen nicht zuverlässig einordnen lässt. Jedoch diskutierte Vadlakonda *et al.* schon 2013 die unterschiedlich nachgeschalteten Wege durch die Phosphorylierung an den verschiedenen Akt-Stellen [387]. So publizierten Kwiatkowski und Manning [388], dass die Phosphorylierung am Thr308 auf die Proteinsynthese abzielt, wohingegen die Akt-Phosphorylierung am Ser473, der Studie von Guo *et al.* nach [389], die FoxO-Proteine beeinflusst und laut Guan *et al.* [390] anti-apoptotische und zellüberlebende Signalwege fördert. Es könnte also sein, dass die separaten Phosphorylierungen doch einen Einfluss ausüben können. Die Analyse der Phosphorylierung von FoxO1 ergab bei den WT-Tieren, verglichen mit Placebotieren, eine signifikante Erhöhung. Die Behandlung mit S-Oxprenolol, verglichen mit der Placebogruppe, zeigte eine Steigerung der FoxO1-Phosphorylierung, d.h. es war weniger total FoxO1 vorhanden. Eine Studie von Kamei *et al.* zeigte, dass eine erhöhte Expression von FoxO1 im Skelettmuskel eine Körpergewichts- sowie Muskelmassen-Abnahme bewirken kann [234]. Darüber hinaus, wurde durch McLoughlin *et al.* publiziert, dass apoptotische Gene durch FoxO1 bei der Muskelatrophie induziert werden [391]. Des Weiteren könnte es sein, dass FoxO1 einen Einfluss auf die Myostatin-Expression nahm, denn interessanterweise kann FoxO1 auch die

Expression von Myostatin regulieren [392]. Somit hat die reduzierte FoxO1-Proteinmenge wohl einen positiven Effekt auf die GC-Muskelmasse durch die Behandlung mit S-Oxprenolol. Wie oben beschrieben wiesen die männlichen Tiere durch die Behandlung mit beiden Dosen S-Oxprenolol eine signifikant reduzierte MuRF1-Expression im GC auf. Auffällig ist, dass die FoxO1-Phosphorylierung bei den Männchen durch die Behandlung mit beiden Dosen S-Oxprenolol signifikant angestiegen ist, was heißt, dass signifikant weniger total FoxO1 vorhanden war. Demnach könnte es sein, dass der reduzierte FoxO1-Level eine verringerte Expression von MuRF1 bewirkte. Bei den Weibchen war das nicht der Fall. Die relative FoxO3a-Phosphorylierung hingegen wies keine Änderung von WT zu Placebos auf, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es zu keiner Induktion der FoxO3a-Phosphorylierung und damit zur Inaktivierung gekommen ist. Bei den männlichen Tieren wurde zwar eine signifikante Runterregulierung der FoxO3a-Phosphorylierung beobachtet, was aber schlecht zu interpretieren ist, aufgrund der grundsätzlichen gleichbleibenden relativen Werte der FoxO3a-Phosphorylierung bei den WT-Tieren, im Vergleich zu Placebos. S-Oxprenolol scheint auch hier den größten Effekt zu haben und die Proteindegradation und damit die Muskelatrophie zu hemmen. Die Behandlung mit Riluzol hat weder einen Einfluss auf die Akt-, noch auf die FoxO1- oder FoxO3a-Phosphorylierung. Die FoxO-Expression wird in diesem Fall also vermutlich nicht über Akt reguliert. Neben Akt besitzt aber auch noch eine andere Proteinkinase, AMPK, bei anabolen Stoffwechselfvorgängen eine wichtige Funktion. AMPK schützt die Zelle vor ATP-Mangel und reguliert den Energiehaushalt der Zelle. AMPK wird durch den AMP- und ATP-Spiegel in der Zelle reguliert und durch Phosphorylierung aktiviert. Die AMPK-Aktivierung induziert eine Inhibition von ATP-verbrauchenden Signalwegen. Interessanterweise wurden bisher noch keine Untersuchungen bezüglich der putativen Veränderungen von AMPK in der Skelettmuskulatur in Bezug auf ALS publiziert. In dieser Arbeit wurde allerdings festgestellt, dass im Allgemeinen bei den gesunden WT-Tieren, im Vergleich zu den kranken Placebotieren, eine verminderte AMPK-Phosphorylierung im GC vorliegt, was vermuten lässt, dass diese Tiere eine normale ATP-Konzentration besitzen und somit der Energiehaushalt im Gleichgewicht ist. Durch die Behandlung mit Rilutek und beiden Dosen S-Oxprenolol kommt es zu einer Reduktion der AMPK-Phosphorylierung, weshalb angenommen werden kann, dass wie bei WT-Tieren ein ausgewogener Energiehaushalt vorliegt, im Vergleich zu den kranken Tieren, die eine hohe AMPK-Phosphorylierung im GC aufwiesen. Nakashima *et al.* konnten bereits zeigen, dass eine AMPK-Aktivierung die Proteindegradation von Myofibrillen stimulieren kann [393]. Des Weiteren ist bekannt, dass AMPK die Autophagy aktivieren kann [394][395], um so Energie für die Zelle zu produzieren.

Daher lässt sich schlussfolgern, dass die signifikante Reduktion der AMPK-Phosphorylierung/Aktivierung durch die Behandlung mit Rilutek und S-Oxprenolol zu einer Inhibition der Proteindegradation im GC geführt hat und es dadurch zu einer verminderten Muskelatrophie gekommen ist. Interessanterweise könnte auch die FoxO-Regulation über AMPK gesteuert gewesen sein. Canto *et al.* beschrieben in einer Studie, dass AMPK eine Deacetylierung und damit die Aktivierung von FoxO1 und FoxO3 im Muskel bewirken kann [396]. Demnach könnte die reduzierte AMPK-Aktivierung zu der signifikant erhöhten FoxO1-Phosphorylierung, d.h. zu einem erniedrigten total FoxO1-Konzentration im GC, geführt haben.

Neben der Expression von Atrogenen sind für die Muskelatrophie ebenso das UPS, Apoptose und Autophagie von entscheidener Bedeutung. Des Weiteren stehen diese Prozesse eng miteinander in Beziehung. Es ist bekannt, dass das UPS und die Autophagie im Zusammenspiel die intrazelluläre Akkumulation von mutierten SOD1-Aggregaten entfernen [397]. Des Weiteren deuten einige Studien daraufhin, dass zwischen Apoptose und Autophagie eine Interaktion besteht [398][399]. Zunächst konnte festgestellt werden, dass bei den G93A-SOD1-Mäusen das UPS im GC, im Vergleich zu gesunden WT-Mäusen, aktiviert wird. Dabei scheint es aber so, als ob die Aktivierung des UPS bei den Weibchen eine größere Rolle spielt. Die UPS-Aktivität war bei den kranken Placeboweibchen, verglichen mit gesunden Tieren, signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu konnte bei den Männchen nur ein leichter Anstieg der UPS-Aktivität beobachtet werden. Allerdings wurde 2015 eine Studie veröffentlicht, in der die UPS-Aktivität, zum gleichen Zeitpunkt wie in dieser Arbeit, bei G93A-SOD1-Mäusen signifikant gesenkt war. Oliván *et al.* postulierten, dass die Proteasom-Aktivität am Anfang der ALS eine entscheidendere Rolle spielt als am Ende [400]. Hinzu kommt, dass die Autoren beobachten konnten, dass die Aktivierung der Autophagie zum Ende der ALS zunimmt. Es scheint also so, als ob die Induktion der Autophagie und des UPS abhängig von der ALS-Krankheitsstufe ist. Im kachektischen Rattenmodell Yoshida Hepatoma jedoch konnte ebenfalls, im Vergleich zu nicht kachektischen Ratten, eine Aktivierung des UPS im GC durch die signifikante Erhöhung der Trypsin-, Chymotrypsin- und PGPH-ähnlichen Aktivität festgestellt werden [401]. Interessanterweise bewirkte die Behandlung mit 20 mg/kg/d R-Oxprenolol, verglichen mit Placebotieren, einen signifikanten Anstieg der UPS-Aktivität bei den Männchen. Die Behandlung mit der höheren Dosis S-Oxprenolol erhöhte, im Vergleich zur Placebogruppe, ebenfalls die UPS-Aktivität. Rilutek besitzt bei beiden Geschlechtern keinen signifikanten Einfluss auf die Chymotrypsin-ähnliche und PGPH-Aktivität. Allerdings konnte festgestellt werden, dass durch die Rilutek-Behandlung, verglichen

mit Placebos, die Trypsin-ähnliche Aktivität reduziert wurde. Demnach scheint die Behandlung mit den β -Blockern keinen positiven Einfluss auf die UPS-Aktivität bei den Männchen zu haben. Ohnehin konnte bei den behandelten Männchen, im Vergleich zu den Placebos, auch keine starke Abschwächung der GC-Muskelmasse festgestellt werden. Bei den Weibchen hingegen scheint die Behandlung mit *R*- und *S*-Oxprenolol einen Effekt auf die UPS-Aktivität zu haben. Durch *R*- und *S*-Oxprenolol wurde die UPS-Aktivität, bei der Trypsin-ähnlichen Aktivität sogar signifikant, gegenüber den Placebotieren, gesenkt. Die Reduktion der UPS-Aktivität ist aber vermutlich nicht auf einen geringeren Proteinlevel vom Ubiquitin zurückzuführen, denn der Ubiquitin-Proteinlevel hat sich weder bei den Männchen noch bei den Weibchen signifikant durch die Behandlung verändert. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Behandlung mit den β -Blockern bei den Weibchen effektiver zu sein scheint als bei den Männchen. Die reduzierte UPS-Aktivität im GC bei den Weibchen lässt vermuten, dass auch die Proteindegradation im GC sinkt und deshalb auch die GC-Muskelmasse, wie beschrieben, signifikant höher war als bei Placebotieren. Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Aktivitätsanalyse der Effektorcaspasen-3 und -6 im GC beobachtet werden. Es kam zu einer Induktion der Apoptose in kranken G93A-SOD1-Mäusen. Die gesunden WT-Tiere wiesen einen gesenkten Aktivitätslevel der Caspasen-3 und -6 gegenüber den Placebotieren auf. Eine erhöhte Caspase-3-Aktivität konnte bereits durch Dobrowolny *et al.* in Muskeln der G93A-SOD1-Maus gezeigt werden [244]. Ziel war es durch die Behandlung die Caspase-Aktivität zu senken, denn es wurde bereits publiziert, dass Caspase-3 Proteasomen in Myotuben aktivieren kann [402]. Es konnte auch schon bewiesen werden, dass eine Inhibition von Caspase-3 die Proteolyse in Muskeln von Ratten reduziert [403]. Bei den Männchen kam es allerdings zu einer signifikanten Caspase-3- und zu einer Caspase-6-Aktivitätssteigerung im GC durch die Behandlung mit *R*- und *S*-Oxprenolol. Interessanterweise wurde im G93A-SOD1-Mausmodell in einer kürzlich erschienenen Studie von Hogg *et al.* festgestellt, dass Caspase-6 eine protektive Wirkung im ZNS besitzt und die Motorik verbessert [404]. Wie bereits unter Punkt 4.2.3 geschildert, besteht zwischen Motoneuronen und Muskeln eine enge Kommunikation. Daher könnte es durchaus sein, dass die erhöhte Caspase-6-Aktivität im GC durch die Behandlung mit 10 mg/kg/d *S*-Oxprenolol ebenfalls eine protektive Wirkung besitzt. Denkbar wäre auch, dass die signifikant erhöhte Caspase-3-Aktivität im GC bei den Männchen durch die Behandlung mit beiden Dosen *S*-Oxprenolol eine protektive Wirkung hat. Im Gegensatz dazu war die Caspase-3-Aktivität bei den Weibchen durch die β -Blocker-Behandlung gesenkt, wobei die höhere Dosis *S*-Oxprenolol den größten Effekt zeigte und die Caspase-3-Aktivität, im Vergleich zu Placebotieren, reduzierte. Somit ist anzunehmen, dass es durch die

behandlungsbedingte Hemmung der Caspase-3 zu einer reduzierten GC-Muskel-Proteolyse bei den Weibchen kommt. Es ist bekannt, dass bei fortgeschrittener Muskelatrophie die Caspase-abhängige Apoptose in Muskeln parallel zur Motoneurondegeneration vermehrt aktiviert wird [244]. Daher könnte es sein, dass die reduzierte Caspase-3-Aktivität im GC bei den Weibchen durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d S-Oxprenolol darauf beruht, weil auch die Motoneuronendegeneration durch 20 mg/kg/d S-Oxprenolol gesenkt wurde. Allerdings haben Dobrowolny *et al.* auf Proteinebene bei WT-Tieren, im Vergleich zu G93A-SOD1-Mäusen, einen erhöhten Procaspase-3-Level beobachtet [244], was gegensätzlich zu den Ergebnissen in dieser Arbeit ist. Daher könnte es sein, dass die Aktivitätssenkung bei den Weibchen aus einem geringeren Procaspase-3-Level im GC beruht. Dennoch konnte in einer anderen Publikation gezeigt werden, dass der Procaspase-3-Level im Skelettmuskel zum gleichen Zeitpunkt der ALS-Progression, wie in dieser Arbeit, bei den WT-Tieren signifikant gesenkt war, was die Ergebnisse aus dieser Arbeit bestätigen würde. Allerdings postulierten die Autoren auch, dass keine Apoptose-Aktivität in der Skelettmuskulatur von G93A-SOD1-Mäusen zu finden ist [400]. Die Caspase-6-Aktivität in den behandelten Weibchen, verglichen mit der Placebogruppe, blieb unverändert.

Neben dem UPS und der Apoptose spielt die Autophagie bei der Muskelatrophie eine bedeutende Rolle. In der vorliegenden Arbeit waren die Expressionslevel von Beclin-1, ATG12 und das Verhältnis von LC3II/LC3I auf Proteinebene bei den kranken Placebotieren, im Gegensatz zu den gesunden WT-Tieren, erhöht. Daher scheint die Autophagie im GC bei der ALS induziert zu sein. Capitanio *et al.* machten die gleichen Beobachtungen und postulierten eine Autophagie-Induktion im GC in der späten Phase der ALS [343]. Wir konnten ebenfalls schon zeigen, dass unter kachektischen Bedingungen die Autophagie im GC erhöht ist. Allerdings war, im Gegensatz zu Beclin-1 und ATG12, nur das Verhältnis vom LC3I/LC3II-Proteinlevel signifikant erhöht [310]. Die Beclin-1-Proteinexpression wird durch die Behandlung mit 20 mg/kg/d R-Oxprenolol herabgesetzt. Die Proteinexpression von ATG12 hingegen wurde kaum durch die Behandlung mit den β -Blockern R- und S-Oxprenolol beeinflusst. Es kam eher zu einem negativen Effekt durch die Behandlung mit 10 mg/kg/d S-Oxprenolol, indem die Proteinexpression von ATG12 erhöht vorlag, was bedeutet, dass in diesem Fall höchstwahrscheinlich die Autophagie und damit der Proteinabbau verstärkt wurde. Allerdings führte auch die Behandlung mit 20 mg/kg/d R-Oxprenolol, wie bei Beclin-1, zu einer Minderung der relativen Menge von LC3-II. S-Oxprenolol bewirkte ebenfalls eine Reduzierung des LC3-II/LC3-I-Proteinverhältnisses auf WT-Niveau. Interessanterweise konnte in *myosin light chain* (MLC)/G93A-SOD1-Mäusen, in welcher die Überexpression von mSOD1 auf die Skelettmuskulatur beschränkt ist,

gezeigt werden, dass die Inaktivierung von LC3 zu einer Verbesserung des Muskelphänotypes führte [405]. Es scheint also so, dass sich die Behandlung mit *R*- und *S*-Oxprenolol positiv auf die Autophagie ausgewirkt hat.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass *R*- und *S*-Oxprenolol sehr gute Kandidaten sind, um die ALS-assoziierte Kachexie zu behandeln und sogar lebensverlängernd wirken. Zudem haben die hier verwendeten β -Blocker, die schon Jahre lang beim Patienten angewendet werden, wenige Nebenwirkungen [331]. *S*-Oxprenolol scheint in dieser Arbeit effektiver als *R*-Oxprenolol zu sein. Allerdings bedarf es noch weitere Untersuchungen. Die positiven Eigenschaften des *S*-Enantiomer angereicherten Oxprenolols wurden in einem Patent von Coats *et al.* für u.a. der Behandlung von Kachexie [406] und ALS [407] bereits kürzlich beschrieben.

5 LITERATUR

- [1] P. M. Worms, "The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies.," *J. Neurol. Sci.*, vol. 191, no. 1–2, pp. 3–9, Oct. 2001.
- [2] G. Logroscino, B. J. Traynor, O. Hardiman, A. Chiò, D. Mitchell, R. J. Swingler, A. Millul, E. Benn, and E. Beghi, "Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe.," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 81, no. 4, pp. 385–90, Apr. 2010.
- [3] M. C. Vázquez, C. Ketzoián, C. Legnani, I. Rega, N. Sánchez, A. Perna, M. Penela, X. Aguirrezábal, M. Druet-Cabanac, and M. Medici, "Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in Uruguay: a population-based study.," *Neuroepidemiology*, vol. 30, no. 2, pp. 105–11, Jan. 2008.
- [4] P. M. Andersen, "Genetic factors in the early diagnosis of ALS," *Amyotroph. Lateral Scler. Other Mot. Neuron Disord.*, Jul. 2009.
- [5] T. Siddique, D. A. Figlewicz, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines, G. Rouleau, A. J. Jeffers, P. Sapp, W. Y. Hung, J. Bebout, D. McKenna-Yasek, G. Deng, H. R. Horvitz, J. F. Gusella, R. H. Brown, A. D. Roses, R. P. Roos, D. B. Williams, D. W. Mulder, P. C. Watkins, F. Noore, G. Nicholson, R. Reed, B. R. Brooks, B. Festoff, J. P. Antel, R. Tandan, T. L. Munsat, N. G. Laing, J. J. Halperin, F. H. Norris, R. Van Den Bergh, L. Swerts, R. E. Tanzi, B. Jubelt, K. D. Mathews, and E. P. Bosch, "Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity," *N. Engl. J. Med.*, vol. 324, no. 20, May 1991.
- [6] D. R. ROSEN, T. Siddique, D. Patterson, D. A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J. P. O'Regan, and H. X. Deng, "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis.," *Nature*, vol. 362, no. 6415, pp. 59–62, Mar. 1993.
- [7] F. H. Norris, R. A. Smith, and E. H. Denys, "Motor neurone disease: towards better care.," *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*, vol. 291, no. 6490, pp. 259–62, Jul. 1985.
- [8] S. Ash, C. Olm, C. T. McMillan, A. Boller, D. J. Irwin, L. McCluskey, L. Elman, and M. Grossman, "Deficits in sentence expression in amyotrophic lateral sclerosis.," *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, vol. 16, no. 1–2, pp. 31–9, Mar. 2015.
- [9] F. Norris, E. Denys, and U. Sang, "Old and new clinical problems in amyotrophic lateral sclerosis," *Tsubaki T, Toyokura Y, Amyotroph. Lateral Sclerosis. Univ. Park Press. Balt.*, pp. 3–26, 1979.
- [10] A. D. Walling, "Amyotrophic lateral sclerosis: Lou Gehrig's disease.," *Am. Fam. Physician*, vol. 59, no. 6, pp. 1489–96, Mar. 1999.
- [11] O. Dornblüth, "An anatomical investigation of a case of amyotrophic lateral sclerosis," *Neur Zbl* 13, 1889.
- [12] A. Braumühl, "Pick's disease and amyotrophic lateral sclerosis," *Allg. Zeitschrift für Psychiatr. Psychol.* ..., 1932.
- [13] A. Kurt, F. Nijboer, T. Matuz, and A. Kübler, "Depression and anxiety in individuals with amyotrophic lateral sclerosis: epidemiology and management.," *CNS Drugs*, vol. 21, no. 4, pp. 279–91, Jan. 2007.
- [14] E. R. McDonald, S. A. Wiedenfeld, A. Hillel, C. L. Carpenter, and R. A. Walter, "Survival in amyotrophic lateral sclerosis. The role of psychological factors.," *Arch. Neurol.*, vol. 51, no. 1, pp. 17–23, Jan. 1994.
- [15] M. Johnston, L. Earll, M. Giles, R. McClenahan, D. Stevens, and V. Morrison, "Mood as a predictor of disability and survival in patients newly diagnosed with ALS/MND," *Br. J. Health Psychol.*, vol. 4, no. 2, pp. 127–136, May 1999.

- [16] E. Feneberg, A. Hübers, J. Weishaupt, A. Ludolph, and M. Otto, "Genetik und Neurochemische Biomarker bei Amyotropher Lateralsklerose und Frontotemporaler Lobärdegeneration," *Aktuelle Neurol.*, vol. 41, no. 04, pp. 239–247, May 2014.
- [17] A. Leveille, J. Kiernan, J. A. Goodwin, and J. Antel, "Eye movements in amyotrophic lateral sclerosis," *Arch. Neurol.*, vol. 39, no. 11, pp. 684–6, Nov. 1982.
- [18] M. Gorges, H.-P. Müller, D. Lulé, K. Del Tredici, J. Brettschneider, J. Keller, K. Pfandl, A. C. Ludolph, J. Kassubek, and E. H. Pinkhardt, "Eye Movement Deficits Are Consistent with a Staging Model of pTDP-43 Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis.," *PLoS One*, vol. 10, no. 11, p. e0142546, Jan. 2015.
- [19] P.-F. Pradat, G. Bruneteau, E. Munerati, F. Salachas, N. Le Forestier, L. Lacomblez, T. Lenglet, and V. Meininger, "Extrapyramidal stiffness in patients with amyotrophic lateral sclerosis.," *Mov. Disord.*, vol. 24, no. 14, pp. 2143–8, Oct. 2009.
- [20] M. R. Turner, J. Abisgold, D. G. R. Yeates, K. Talbot, and M. J. Goldacre, "Head and other physical trauma requiring hospitalisation is not a significant risk factor in the development of ALS.," *J. Neurol. Sci.*, vol. 288, no. 1–2, pp. 45–8, Jan. 2010.
- [21] A. Truini, A. Biasiotta, E. Onesti, G. Di Stefano, M. Ceccanti, S. La Cesa, A. Pepe, C. Giordano, G. Cruccu, and M. Inghilleri, "Small-fibre neuropathy related to bulbar and spinal-onset in patients with ALS.," *J. Neurol.*, vol. 262, no. 4, pp. 1014–8, Jan. 2015.
- [22] H.-F. Li and Z.-Y. Wu, "Genotype-phenotype correlations of amyotrophic lateral sclerosis.," *Transl. Neurodegener.*, vol. 5, p. 3, Jan. 2016.
- [23] D. Bäumer, K. Talbot, and M. R. Turner, "Advances in motor neurone disease.," *J. R. Soc. Med.*, vol. 107, no. 1, pp. 14–21, Jan. 2014.
- [24] R. Tortelli, F. L. Conforti, R. Cortese, E. D'Errico, E. Distaso, R. Mazzei, C. Ungaro, A. Magariello, A. Gambardella, G. Logroscino, and I. L. Simone, "Amyotrophic lateral sclerosis: a new missense mutation in the SOD1 gene.," *Neurobiol. Aging*, vol. 34, no. 6, pp. 1709.e3–5, Jun. 2013.
- [25] S. C. Barber and P. J. Shaw, "Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 48, no. 5, pp. 629–41, Mar. 2010.
- [26] P. C. Wong, C. A. Pardo, D. R. Borchelt, M. K. Lee, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, S. S. Sisodia, D. W. Cleveland, and D. L. Price, "An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria.," *Neuron*, vol. 14, no. 6, pp. 1105–16, Jun. 1995.
- [27] Y. Guo, W. Duan, Z. Li, J. Huang, Y. Yin, K. Zhang, Q. Wang, Z. Zhang, and C. Li, "Decreased GLT-1 and increased SOD1 and HO-1 expression in astrocytes contribute to lumbar spinal cord vulnerability of SOD1-G93A transgenic mice.," *FEBS Lett.*, vol. 584, no. 8, pp. 1615–22, Apr. 2010.
- [28] J. D. Rothstein, S. Patel, M. R. Regan, C. Haenggeli, Y. H. Huang, D. E. Bergles, L. Jin, M. Dykes Hoberg, S. Vidensky, D. S. Chung, S. V. Toan, L. I. Bruijn, Z.-Z. Su, P. Gupta, and P. B. Fisher, "Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression.," *Nature*, vol. 433, no. 7021, pp. 73–7, Jan. 2005.
- [29] P. Pasinelli and R. H. Brown, "Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 7, no. 9, pp. 710–723, 2006.
- [30] M. R. Turner, O. Hardiman, M. Benatar, B. R. Brooks, A. Chio, M. de Carvalho, P. G. Ince, C. Lin, R. G. Miller, H. Mitsumoto, G. Nicholson, J. Ravits, P. J. Shaw, M. Swash, K. Talbot, B. J. Traynor, L. H. Van den Berg, J. H. Veldink, S. Vucic, and M. C. Kiernan, "Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis," *Lancet Neurol.*, vol. 12, no. 3, pp. 310–322, Mar. 2013.
- [31] M. E. Gurney, H. Pu, a Y. Chiu, M. C. Dal Canto, C. Y. Polchow, D. D. Alexander, J. Caliendo, a Hentati, Y. W. Kwon, and H. X. Deng, "Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation.," *Science*, vol. 264, no. 5166, pp. 1772–1775, 1994.
- [32] M. DeJesus-Hernandez, I. R. Mackenzie, B. F. Boeve, A. L. Boxer, M. Baker, N. J.

- Rutherford, A. M. Nicholson, N. A. Finch, H. Flynn, J. Adamson, N. Kouri, A. Wojtas, P. Sengdy, G.-Y. R. Hsiung, A. Karydas, W. W. Seeley, K. A. Josephs, G. Coppola, D. H. Geschwind, Z. K. Wszolek, H. Feldman, D. S. Knopman, R. C. Petersen, B. L. Miller, D. W. Dickson, K. B. Boylan, N. R. Graff-Radford, and R. Rademakers, "Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS.," *Neuron*, vol. 72, no. 2, pp. 245–56, Oct. 2011.
- [33] T. Philips and J. D. Rothstein, "Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis.," *Curr. Protoc. Pharmacol.*, vol. 69, pp. 5.67.1–5.67.21, Jan. 2015.
- [34] J. Chew, T. F. Gendron, M. Prudencio, H. Sasaguri, Y.-J. Zhang, M. Castanedes-Casey, C. W. Lee, K. Jansen-West, A. Kurti, M. E. Murray, K. F. Bieniek, P. O. Bauer, E. C. Whitelaw, L. Rousseau, J. N. Stankowski, C. Stetler, L. M. Daugherty, E. A. Perkerson, P. Desaro, A. Johnston, K. Overstreet, D. Edbauer, R. Rademakers, K. B. Boylan, D. W. Dickson, J. D. Fryer, and L. Petrucelli, "Neurodegeneration. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits.," *Science*, vol. 348, no. 6239, pp. 1151–4, Jun. 2015.
- [35] M. Polymenidou, C. Lagier-Tourenne, K. R. Hutt, C. F. Bennett, D. W. Cleveland, and G. W. Yeo, "Misregulated RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis.," *Brain Res.*, vol. 1462, pp. 3–15, Jun. 2012.
- [36] H. Deng, K. Gao, and J. Jankovic, "The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases.," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 10, no. 6, pp. 337–48, Jun. 2014.
- [37] T. J. Kwiatkowski, D. A. Bosco, A. L. Leclerc, E. Tamrazian, C. R. Vanderburg, C. Russ, A. Davis, J. Gilchrist, E. J. Kasarskis, T. Munsat, P. Valdmanis, G. A. Rouleau, B. A. Hosler, P. Cortelli, P. J. de Jong, Y. Yoshinaga, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, J. Yan, N. Ticozzi, T. Siddique, D. McKenna-Yasek, P. C. Sapp, H. R. Horvitz, J. E. Landers, and R. H. Brown, "Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis.," *Science*, vol. 323, no. 5918, pp. 1205–8, Feb. 2009.
- [38] J. Yan, H.-X. Deng, N. Siddique, F. Fecto, W. Chen, Y. Yang, E. Liu, S. Donkervoort, J. G. Zheng, Y. Shi, K. B. Ahmeti, B. Brooks, W. K. Engel, and T. Siddique, "Frameshift and novel mutations in FUS in familial amyotrophic lateral sclerosis and ALS/dementia.," *Neurology*, vol. 75, no. 9, pp. 807–14, Aug. 2010.
- [39] S. Millecamps, S. Boillée, I. Le Ber, D. Seilhean, E. Teyssou, M. Giraudeau, C. Moigneu, N. Vandenberghe, V. Danel-Brunaud, P. Corcia, P.-F. Pradat, N. Le Forestier, L. Lacomblez, G. Bruneteau, W. Camu, A. Brice, C. Cazeneuve, E. Leguern, V. Meininger, and F. Salachas, "Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in C9ORF72 and patients with mutations in other ALS-related genes.," *J. Med. Genet.*, vol. 49, no. 4, pp. 258–63, Apr. 2012.
- [40] I. R. Mackenzie, R. Rademakers, and M. Neumann, "TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia.," *Lancet. Neurol.*, vol. 9, no. 10, pp. 995–1007, Oct. 2010.
- [41] E. S. Arnold, S.-C. Ling, S. C. Huelga, C. Lagier-Tourenne, M. Polymenidou, D. Ditsworth, H. B. Kordasiewicz, M. McAlonis-Downes, O. Platoshyn, P. A. Parone, S. Da Cruz, K. M. Clutario, D. Swing, L. Tessarollo, M. Marsala, C. E. Shaw, G. W. Yeo, and D. W. Cleveland, "ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 8, pp. E736–45, Feb. 2013.
- [42] W. Wang, L. Li, W.-L. Lin, D. W. Dickson, L. Petrucelli, T. Zhang, and X. Wang, "The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 22, no. 23, pp. 4706–19, Dec. 2013.
- [43] J. Kirby, E. F. Goodall, W. Smith, J. R. Highley, R. Masanzu, J. A. Hartley, R. Hibberd, H. C. Hollinger, S. B. Wharton, K. E. Morrison, P. G. Ince, C. J. McDermott, and P. J. Shaw, "Broad clinical phenotypes associated with TAR-DNA binding protein (TARDBP) mutations in amyotrophic lateral sclerosis.," *Neurogenetics*, vol. 11, no. 2, pp. 217–25, May 2010.

- [44] S. Yamashita and Y. Ando, "Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis.," *Transl. Neurodegener.*, vol. 4, p. 13, Jan. 2015.
- [45] Q. Li, N. Y. Spencer, N. J. Pantazis, and J. F. Engelhardt, "Alsin and SOD1(G93A) proteins regulate endosomal reactive oxygen species production by glial cells and proinflammatory pathways responsible for neurotoxicity.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 46, pp. 40151–62, Nov. 2011.
- [46] A. Otomo, R. Kunita, K. Suzuki-Utsunomiya, H. Mizumura, K. Onoe, H. Osuga, S. Hadano, and J.-E. Ikeda, "ALS2/alsin deficiency in neurons leads to mild defects in macropinocytosis and axonal growth.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 370, no. 1, pp. 87–92, May 2008.
- [47] A. L. Nishimura, M. Mitne-Neto, H. C. A. Silva, A. Richieri-Costa, S. Middleton, D. Cascio, F. Kok, J. R. M. Oliveira, T. Gillingwater, J. Webb, P. Skehel, and M. Zatz, "A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 75, no. 5, pp. 822–31, Nov. 2004.
- [48] J. O. Johnson, J. Mandrioli, M. Benatar, Y. Abramzon, V. M. Van Deerlin, J. Q. Trojanowski, J. R. Gibbs, M. Brunetti, S. Gronka, J. Wu, J. Ding, L. McCluskey, M. Martinez-Lage, D. Falcone, D. G. Hernandez, S. Arepalli, S. Chong, J. C. Schymick, J. Rothstein, F. Landi, Y.-D. Wang, A. Calvo, G. Mora, M. Sabatelli, M. R. Monsurro, S. Battistini, F. Salvi, R. Spataro, P. Sola, G. Borghero, G. Galassi, S. W. Scholz, J. P. Taylor, G. Restagno, A. Chiò, and B. J. Traynor, "Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS.," *Neuron*, vol. 68, no. 5, pp. 857–64, Dec. 2010.
- [49] S. Chen, P. Sayana, X. Zhang, and W. Le, "Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update.," *Mol. Neurodegener.*, vol. 8, no. 1, p. 28, Jan. 2013.
- [50] C. C. Wehl, P. Temiz, S. E. Miller, G. Watts, C. Smith, M. Forman, P. I. Hanson, V. Kimonis, and A. Pestronk, "TDP-43 accumulation in inclusion body myopathy muscle suggests a common pathogenic mechanism with frontotemporal dementia.," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 79, no. 10, pp. 1186–9, Oct. 2008.
- [51] H.-X. Deng, W. Chen, S.-T. Hong, K. M. Boycott, G. H. Gorrie, N. Siddique, Y. Yang, F. Fecto, Y. Shi, H. Zhai, H. Jiang, M. Hirano, E. Rampersaud, G. H. Jansen, S. Donkervoort, E. H. Bigio, B. R. Brooks, K. Ajroud, R. L. Sufit, J. L. Haines, E. Mugnaini, M. A. Pericak-Vance, and T. Siddique, "Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia.," *Nature*, vol. 477, no. 7363, pp. 211–5, Sep. 2011.
- [52] Y.-Z. Chen, C. L. Bennett, H. M. Huynh, I. P. Blair, I. Puls, J. Irobi, I. Dierick, A. Abel, M. L. Kennerson, B. A. Rabin, G. A. Nicholson, M. Auer-Grumbach, K. Wagner, P. De Jonghe, J. W. Griffin, K. H. Fischbeck, V. Timmerman, D. R. Cornblath, and P. F. Chance, "DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4).," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 74, no. 6, pp. 1128–35, Jun. 2004.
- [53] M. Hirano, C. M. Quinzii, H. Mitsumoto, A. P. Hays, J. K. Roberts, P. Richard, and L. P. Rowland, "Senataxin mutations and amyotrophic lateral sclerosis.," *Amyotroph. Lateral Scler.*, vol. 12, no. 3, pp. 223–7, May 2011.
- [54] A. Orlacchio, C. Babalini, A. Borreca, C. Patrono, R. Massa, S. Basaran, R. P. Munhoz, E. A. Rogaeva, P. H. St George-Hyslop, G. Bernardi, and T. Kawarai, "SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis.," *Brain*, vol. 133, no. Pt 2, pp. 591–8, Feb. 2010.
- [55] R. P. Murmu, E. Martin, A. Rastetter, T. Esteves, M.-P. Muriel, K. H. El Hachimi, P. S. Denora, A. Dauphin, J. C. Fernandez, C. Duyckaerts, A. Brice, F. Darios, and G. Stevanin, "Cellular distribution and subcellular localization of spatacsin and spastizin, two proteins involved in hereditary spastic paraplegia.," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 47, no. 3, pp. 191–202, Jul. 2011.
- [56] D. Wu, W. Yu, H. Kishikawa, R. D. Folkerth, A. J. Iafrate, Y. Shen, W. Xin, K. Sims, and G.-F. Hu, "Angiogenin loss-of-function mutations in amyotrophic lateral sclerosis.," *Ann. Neurol.*, vol. 62, no. 6, pp. 609–17, Dec. 2007.

- [57] A. K. Padhi, H. Kumar, S. V. Vasaikar, B. Jayaram, and J. Gomes, "Mechanisms of loss of functions of human angiogenin variants implicated in amyotrophic lateral sclerosis," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, p. e32479, Jan. 2012.
- [58] M. A. van Es, F. P. Diekstra, J. H. Veldink, F. Baas, P. R. Bourque, H. J. Schelhaas, E. Strengman, E. A. M. Hennekam, D. Lindhout, R. A. Ophoff, and L. H. van den Berg, "A case of ALS-FTD in a large FALS pedigree with a K17I ANG mutation.," *Neurology*, vol. 72, no. 3, pp. 287–8, Jan. 2009.
- [59] A. Al-Saif, F. Al-Mohanna, and S. Bohlega, "A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis.," *Ann. Neurol.*, vol. 70, no. 6, pp. 913–9, Dec. 2011.
- [60] C. Y. Chow, J. E. Landers, S. K. Bergren, P. C. Sapp, A. E. Grant, J. M. Jones, L. Everett, G. M. Lenk, D. M. McKenna-Yasek, L. S. Weisman, D. Figlewicz, R. H. Brown, and M. H. Meisler, "Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 84, no. 1, pp. 85–8, Jan. 2009.
- [61] H. Maruyama, H. Morino, H. Ito, Y. Izumi, H. Kato, Y. Watanabe, Y. Kinoshita, M. Kamada, H. Nodera, H. Suzuki, O. Komure, S. Matsuura, K. Kobatake, N. Morimoto, K. Abe, N. Suzuki, M. Aoki, A. Kawata, T. Hirai, T. Kato, K. Ogasawara, A. Hirano, T. Takumi, H. Kusaka, K. Hagiwara, R. Kaji, and H. Kawakami, "Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis.," *Nature*, vol. 465, no. 7295, pp. 223–6, May 2010.
- [62] C.-H. Wu, C. Fallini, N. Ticozzi, P. J. Keagle, P. C. Sapp, K. Piotrowska, P. Lowe, M. Koppers, D. McKenna-Yasek, D. M. Baron, J. E. Kost, P. Gonzalez-Perez, A. D. Fox, J. Adams, F. Taroni, C. Tiloca, A. L. Leclerc, S. C. Chafe, D. Mangroo, M. J. Moore, J. A. Zitzewitz, Z.-S. Xu, L. H. van den Berg, J. D. Glass, G. Siciliano, E. T. Cirulli, D. B. Goldstein, F. Salachas, V. Meininger, W. Rossoll, A. Ratti, C. Gellera, D. A. Bosco, G. J. Bassell, V. Silani, V. E. Drory, R. H. Brown, and J. E. Landers, "Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis.," *Nature*, vol. 488, no. 7412, pp. 499–503, Aug. 2012.
- [63] C. Y. Chow, Y. Zhang, J. J. Dowling, N. Jin, M. Adamska, K. Shiga, K. Szigeti, M. E. Shy, J. Li, X. Zhang, J. R. Lupski, L. S. Weisman, and M. H. Meisler, "Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J.," *Nature*, vol. 448, no. 7149, pp. 68–72, Jul. 2007.
- [64] V. Majcher, A. Goode, V. James, and R. Layfield, "Autophagy receptor defects and ALS-FTLD.," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 66, no. Pt A, pp. 43–52, May 2015.
- [65] D. A. Figlewicz, A. Krizus, M. G. Martinoli, V. Meininger, M. Dib, G. A. Rouleau, and J. P. Julien, "Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 3, no. 10, pp. 1757–61, Oct. 1994.
- [66] J. M. Beaulieu, M. D. Nguyen, and J. P. Julien, "Late onset of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin.," *J. Cell Biol.*, vol. 147, no. 3, pp. 531–44, Nov. 1999.
- [67] J. Robertson, M. M. Doroudchi, M. D. Nguyen, H. D. Durham, M. J. Strong, G. Shaw, J.-P. Julien, and W. E. Mushynski, "A neurotoxic peripherin splice variant in a mouse model of ALS.," *J. Cell Biol.*, vol. 160, no. 6, pp. 939–49, Mar. 2003.
- [68] J. H. Veldink, L. H. van den Berg, J. M. Cobben, R. P. Stulp, J. M. De Jong, O. J. Vogels, F. Baas, J. H. Wokke, and H. Scheffer, "Homozygous deletion of the survival motor neuron 2 gene is a prognostic factor in sporadic ALS.," *Neurology*, vol. 56, no. 6, pp. 749–52, Mar. 2001.
- [69] M. Saeed, N. Siddique, W. Y. Hung, E. Usacheva, E. Liu, R. L. Sufit, S. L. Heller, J. L. Haines, M. Pericak-Vance, and T. Siddique, "Paraoxonase cluster polymorphisms are associated with sporadic ALS.," *Neurology*, vol. 67, no. 5, pp. 771–6, Sep. 2006.
- [70] N. Ticozzi, A. L. LeClerc, P. J. Keagle, J. D. Glass, A.-M. Wills, M. van Blitterswijk, D. A. Bosco, I. Rodriguez-Leyva, C. Gellera, A. Ratti, F. Taroni, D. McKenna-Yasek, P. C. Sapp, V. Silani, C. E. Furlong, R. H. Brown, and J. E. Landers, "Paraoxonase gene mutations in amyotrophic lateral sclerosis," *Ann. Neurol.*, vol. 68, no. 1, pp. 102–107,

May 2010.

- [71] G. Giordano, T. B. Cole, C. E. Furlong, and L. G. Costa, "Paraoxonase 2 (PON2) in the mouse central nervous system: a neuroprotective role?," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 256, no. 3, pp. 369–78, Nov. 2011.
- [72] J. C. Schymick, Y. Yang, P. M. Andersen, J. P. Vonsattel, M. Greenway, P. Momeni, J. Elder, A. Chiò, G. Restagno, W. Robberecht, C. Dahlberg, O. Mukherjee, A. Goate, N. Graff-Radford, R. J. Caselli, M. Hutton, J. Gass, A. Cannon, R. Rademakers, A. B. Singleton, O. Hardiman, J. Rothstein, J. Hardy, and B. J. Traynor, "Progranulin mutations and amyotrophic lateral sclerosis or amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia phenotypes.," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 78, no. 7, pp. 754–6, Jul. 2007.
- [73] D. Lambrechts, K. Poesen, R. Fernández-Santiago, A. Al-Chalabi, R. Del Bo, P. W. J. Van Vught, S. Khan, S. L. Marklund, A. Brockington, I. van Marion, J. Anneser, C. Shaw, A. C. Ludolph, N. P. Leigh, G. P. Comi, T. Gasser, P. J. Shaw, K. E. Morrison, P. M. Andersen, L. H. Van den Berg, V. Thijs, T. Siddique, W. Robberecht, and P. Carmeliet, "Meta-analysis of vascular endothelial growth factor variations in amyotrophic lateral sclerosis: increased susceptibility in male carriers of the -2578AA genotype.," *J. Med. Genet.*, vol. 46, no. 12, pp. 840–6, Dec. 2009.
- [74] M. R. Vasko, C. Guo, E. L. Thompson, and M. R. Kelley, "The repair function of the multifunctional DNA repair/redox protein APE1 is neuroprotective after ionizing radiation.," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 10, no. 9, pp. 942–52, Sep. 2011.
- [75] A. C. Elden, H.-J. Kim, M. P. Hart, A. S. Chen-Plotkin, B. S. Johnson, X. Fang, M. Armakola, F. Geser, R. Greene, M. M. Lu, A. Padmanabhan, D. Clay-Falcone, L. McCluskey, L. Elman, D. Juhr, P. J. Gruber, U. Rüb, G. Auburger, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee, V. M. Van Deerlin, N. M. Bonini, and A. D. Gitler, "Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS," *Nature*, vol. 466, no. 7310, pp. 1069–1075, Aug. 2010.
- [76] L. E. Cox, L. Ferraiuolo, E. F. Goodall, P. R. Heath, A. Higginbottom, H. Mortiboys, H. C. Hollinger, J. A. Hartley, A. Brockington, C. E. Burness, K. E. Morrison, S. B. Wharton, A. J. Grierson, P. G. Ince, J. Kirby, and P. J. Shaw, "Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS).," *PLoS One*, vol. 5, no. 3, p. e9872, Jan. 2010.
- [77] R. M. Park, P. A. Schulte, J. D. Bowman, J. T. Walker, S. C. Bondy, M. G. Yost, J. A. Touchstone, and M. Dosemeci, "Potential occupational risks for neurodegenerative diseases.," *Am. J. Ind. Med.*, vol. 48, no. 1, pp. 63–77, Jul. 2005.
- [78] B. Callaghan, D. Feldman, K. Gruis, and E. Feldman, "The association of exposure to lead, mercury, and selenium and the development of amyotrophic lateral sclerosis and the epigenetic implications.," *Neurodegener. Dis.*, vol. 8, no. 1–2, pp. 1–8, Jan. 2011.
- [79] M. G. Weisskopf, M. L. McCullough, E. E. Calle, M. J. Thun, M. Cudkovicz, and A. Ascherio, "Prospective study of cigarette smoking and amyotrophic lateral sclerosis.," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 160, no. 1, pp. 26–33, Jul. 2004.
- [80] V. Gallo, H. B. Bueno-De-Mesquita, R. Vermeulen, P. M. Andersen, A. Kyrozis, J. Linseisen, R. Kaaks, N. E. Allen, A. W. Roddam, H. C. Boshuizen, P. H. Peeters, D. Palli, A. Mattiello, S. Sieri, R. Tumino, J.-M. Jiménez-Martín, M. J. T. Díaz, L. R. Suarez, A. Trichopoulou, A. Agudo, L. Arriola, A. Barricante-Gurrea, S. Bingham, K.-T. Khaw, J. Manjer, B. Lindkvist, K. Overvad, F. W. Bach, A. Tjønneland, A. Olsen, M. M. Bergmann, H. Boeing, F. Clavel-Chapelon, E. Lund, G. Hallmans, L. Middleton, P. Vineis, and E. Riboli, "Smoking and risk for amyotrophic lateral sclerosis: analysis of the EPIC cohort.," *Ann. Neurol.*, vol. 65, no. 4, pp. 378–85, Apr. 2009.
- [81] A. Alonso, G. Logroscino, S. S. Jick, and M. A. Hernán, "Association of smoking with amyotrophic lateral sclerosis risk and survival in men and women: a prospective study.," *BMC Neurol.*, vol. 10, p. 6, Jan. 2010.
- [82] H. Wang, É. J. O'Reilly, M. G. Weisskopf, G. Logroscino, M. L. McCullough, M. J. Thun, A. Schatzkin, L. N. Kolonel, and A. Ascherio, "Smoking and risk of amyotrophic lateral

- sclerosis: a pooled analysis of 5 prospective cohorts.," *Arch. Neurol.*, vol. 68, no. 2, pp. 207–13, Feb. 2011.
- [83] E. L. Abel, "Football increases the risk for Lou Gehrig's disease, amyotrophic lateral sclerosis.," *Percept. Mot. Skills*, vol. 104, no. 3 Pt 2, pp. 1251–4, Jun. 2007.
- [84] A. Chiò, G. Benzi, M. Dossena, R. Mutani, and G. Mora, "Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players.," *Brain*, vol. 128, no. Pt 3, pp. 472–6, Mar. 2005.
- [85] P. Kamble, V. Daulatabad, and P. Baji, "Study of anthropological parameters, body composition, strength & endurance in basketball players," *Int. J. Biol. Med. ...*, 2012.
- [86] G. Bensimon, L. Lacomblez, and V. Meininger, "A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 330, no. 9, pp. 585–91, Mar. 1994.
- [87] L. Lacomblez, G. Bensimon, P. N. Leigh, P. Guillet, and V. Meininger, "Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II.," *Lancet (London, England)*, vol. 347, no. 9013, pp. 1425–31, May 1996.
- [88] B. D. Kretschmer, U. Kratzer, and W. J. Schmidt, "Riluzole, a glutamate release inhibitor, and motor behavior.," *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, vol. 358, no. 2, pp. 181–90, Aug. 1998.
- [89] E. Fumagalli, M. Funicello, T. Rauen, M. Gobbi, and T. Mennini, "Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1.," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 578, no. 2–3, pp. 171–6, Jan. 2008.
- [90] G. Schwartz and M. G. Fehlings, "Secondary injury mechanisms of spinal cord trauma: a novel therapeutic approach for the management of secondary pathophysiology with the sodium channel blocker riluzole.," *Prog. Brain Res.*, vol. 137, pp. 177–90, Jan. 2002.
- [91] R. B. Choudry and M. E. Cudkowicz, "Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: the tenuous past and the promising future.," *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 45, no. 12, pp. 1334–44, Dec. 2005.
- [92] R. W. Orrell, R. J. M. Lane, and M. Ross, "Antioxidant treatment for amyotrophic lateral sclerosis / motor neuron disease.," *Cochrane database Syst. Rev.*, no. 1, p. CD002829, Jan. 2005.
- [93] J. Kriz, M. D. Nguyen, and J.-P. Julien, "Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.," *Neurobiol. Dis.*, vol. 10, no. 3, pp. 268–78, Aug. 2002.
- [94] P. H. Gordon, D. H. Moore, R. G. Miller, J. M. Florence, J. L. Verheijde, C. Doorish, J. F. Hilton, G. M. Spitalny, R. B. MacArthur, H. Mitsumoto, H. E. Neville, K. Boylan, T. Mozaffar, J. M. Belsh, J. Ravits, R. S. Bedlack, M. C. Graves, L. F. McCluskey, R. J. Barohn, and R. Tandan, "Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial.," *Lancet. Neurol.*, vol. 6, no. 12, pp. 1045–53, Dec. 2007.
- [95] N. A. G. dos Santos, N. M. Martins, R. de B. Silva, R. S. Ferreira, F. M. Sisti, and A. C. dos Santos, "Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects PC12 cells from MPP+ toxicity by inducing the expression of neuron-typical proteins.," *Neurotoxicology*, vol. 45, pp. 131–8, Dec. 2014.
- [96] E. C. Browne and B. M. Abbott, "Recent progress towards an effective treatment of amyotrophic lateral sclerosis using the SOD1 mouse model in a preclinical setting," *Eur. J. Med. Chem.*, Feb. 2016.
- [97] C. V Fontanilla, X. Wei, L. Zhao, B. Johnstone, R. M. Pascuzzi, M. R. Farlow, and Y. Du, "Caffeic acid phenethyl ester extends survival of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.," *Neuroscience*, vol. 205, pp. 185–93, Mar. 2012.
- [98] T. Federici and N. M. Boulis, "Gene-based treatment of motor neuron diseases.," *Muscle Nerve*, vol. 33, no. 3, pp. 302–23, Mar. 2006.

- [99] M. Azzouz, G. S. Ralph, E. Storkebaum, L. E. Walmsley, K. A. Mitrophanous, S. M. Kingsman, P. Carmeliet, and N. D. Mazarakis, "VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model.," *Nature*, vol. 429, no. 6990, pp. 413–7, May 2004.
- [100] M. Azzouz, A. Hottinger, J. C. Paterna, A. D. Zurn, P. Aebischer, and H. Büeler, "Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 9, no. 5, pp. 803–11, Mar. 2000.
- [101] G. S. Ralph, P. A. Radcliffe, D. M. Day, J. M. Carthy, M. A. Leroux, D. C. P. Lee, L.-F. Wong, L. G. Bilstrand, L. Greensmith, S. M. Kingsman, K. A. Mitrophanous, N. D. Mazarakis, and M. Azzouz, "Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model.," *Nat. Med.*, vol. 11, no. 4, pp. 429–33, Apr. 2005.
- [102] T. M. Miller, A. Pestronk, W. David, J. Rothstein, E. Simpson, S. H. Appel, P. L. Andres, K. Mahoney, P. Allred, K. Alexander, L. W. Ostrow, D. Schoenfeld, E. A. Macklin, D. A. Norris, G. Manousakis, M. Crisp, R. Smith, C. F. Bennett, K. M. Bishop, and M. E. Cudkovicz, "An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study.," *Lancet. Neurol.*, vol. 12, no. 5, pp. 435–42, May 2013.
- [103] G. M. Thomsen, G. Gowing, S. Svendsen, and C. N. Svendsen, "The past, present and future of stem cell clinical trials for ALS.," *Exp. Neurol.*, vol. 262 Pt B, pp. 127–37, Dec. 2014.
- [104] C.-P. Zhao, C. Zhang, S.-N. Zhou, Y.-M. Xie, Y.-H. Wang, H. Huang, Y.-C. Shang, W.-Y. Li, C. Zhou, M.-J. Yu, and S.-W. Feng, "Human mesenchymal stromal cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice.," *Cytotherapy*, vol. 9, no. 5, pp. 414–26, Jan. 2007.
- [105] L. Mazzini, I. Ferrero, V. Luparello, D. Rustichelli, M. Gunetti, K. Mareschi, L. Testa, A. Stecco, R. Tarletti, M. Miglioretti, E. Fava, N. Nasuelli, C. Cisari, M. Massara, R. Vercelli, G. D. Oggioni, A. Carriero, R. Cantello, F. Monaco, and F. Fagioli, "Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial.," *Exp. Neurol.*, vol. 223, no. 1, pp. 229–37, May 2010.
- [106] L. Mazzini, K. Mareschi, I. Ferrero, M. Miglioretti, A. Stecco, S. Servo, A. Carriero, F. Monaco, and F. Fagioli, "Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study.," *Cytotherapy*, vol. 14, no. 1, pp. 56–60, Jan. 2012.
- [107] J. R. Green, Y. Yunusova, M. S. Kuruvilla, J. Wang, G. L. Pattee, L. Synhorst, L. Zinman, and J. D. Berry, "Bulbar and speech motor assessment in ALS: challenges and future directions.," *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, vol. 14, no. 7–8, pp. 494–500, Dec. 2013.
- [108] D. T. Ho, R. Ruthazer, and J. A. Russell, "Shoulder pain in amyotrophic lateral sclerosis.," *J. Clin. Neuromuscul. Dis.*, vol. 13, no. 1, pp. 53–5, Sep. 2011.
- [109] D. J. Thurman, J. A. Stevens, and J. K. Rao, "Practice parameter: Assessing patients in a neurology practice for risk of falls (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology.," *Neurology*, vol. 70, no. 6, pp. 473–9, Feb. 2008.
- [110] S. C. Bourke, M. Tomlinson, T. L. Williams, R. E. Bullock, P. J. Shaw, and G. J. Gibson, "Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial.," *Lancet. Neurol.*, vol. 5, no. 2, pp. 140–7, Feb. 2006.
- [111] W. J. Evans, J. E. Morley, J. Argiles, C. Bales, V. Baracos, D. Guttridge, A. Jatoi, K. Kalantar-Zadeh, H. Lochs, G. Mantovani, D. Marks, W. E. Mitch, M. Muscaritoli, A. Najand, P. Ponikowski, F. Rossi Fanelli, M. Schambelan, A. Schols, M. Schuster, D. Thomas, R. Wolfe, and S. D. Anker, "Cachexia: a new definition.," *Clin Nutr*, vol. 27, no. 6, pp. 793–799, 2008.
- [112] S. von Haehling, M. Lainscak, J. Springer, and S. D. Anker, "Cardiac cachexia: a

- systematic overview," *Pharmacol Ther*, vol. 121, no. 3, pp. 227–252, 2009.
- [113] M. E. Onwuamaegbu, M. Henein, and A. J. Coats, "Cachexia in malaria and heart failure: therapeutic considerations in clinical practice," *Postgr. Med J*, vol. 80, no. 949, pp. 642–649, 2004.
- [114] R. H. Mak, A. T. Ikizler, C. P. Kovesdy, D. S. Raj, P. Stenvinkel, and K. Kalantar-Zadeh, "Wasting in chronic kidney disease," *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, vol. 2, no. 1, pp. 9–25, 2011.
- [115] S. von Haehling, "The wasting continuum in heart failure: from sarcopenia to cachexia," *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 74, no. 4, pp. 367–77, Nov. 2015.
- [116] K. Kalantar-Zadeh, C. Rhee, J. J. Sim, P. Stenvinkel, S. D. Anker, and C. P. Kovesdy, "Why cachexia kills: examining the causality of poor outcomes in wasting conditions," *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, vol. 4, no. 2, pp. 89–94, 2013.
- [117] J. C. Desport, P. M. Preux, T. C. Truong, J. M. Vallat, D. Sautereau, and P. Couratier, "Nutritional status is a prognostic factor for survival in ALS patients," *Neurology*, vol. 53, no. 5, pp. 1059–1059, Sep. 1999.
- [118] W. D. Dewys, C. Begg, P. T. Lavin, P. R. Band, J. M. Bennett, J. R. Bertino, M. H. Cohen, H. O. Douglass, P. F. Engstrom, E. Z. Ezdinli, J. Horton, G. J. Johnson, C. G. Moertel, M. M. Oken, C. Perlia, C. Rosenbaum, M. N. Silverstein, R. T. Skeel, R. W. Sponzo, and D. C. Tormey, "Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group.," *Am. J. Med.*, vol. 69, no. 4, pp. 491–7, Oct. 1980.
- [119] L. Dupuis, P.-F. Pradat, A. C. Ludolph, and J.-P. Loeffler, "Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis.," *Lancet. Neurol.*, vol. 10, no. 1, pp. 75–82, Jan. 2011.
- [120] P. Kühnlein, H.-J. Gdynia, A.-D. Sperfeld, B. Lindner-Pfleghar, A. C. Ludolph, M. Prosiel, and A. Riecker, "Diagnosis and treatment of bulbar symptoms in amyotrophic lateral sclerosis.," *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, vol. 4, no. 7, pp. 366–74, Jul. 2008.
- [121] M.-A. Piquet, "[Nutritional approach for patients with amyotrophic lateral sclerosis].," *Rev. Neurol. (Paris)*, vol. 162 Spec N, pp. 4S177–4S187, Jun. 2006.
- [122] B. Funalot, J.-C. Desport, F. Sturtz, W. Camu, and P. Couratier, "High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis.," *Amyotroph. Lateral Scler.*, vol. 10, no. 2, pp. 113–7, Apr. 2009.
- [123] J.-C. Desport, F. Tornay, M. Lacoste, P.-M. Preux, and P. Couratier, "Hypermetabolism in ALS: correlations with clinical and paraclinical parameters.," *Neurodegener. Dis.*, vol. 2, no. 3–4, pp. 202–7, Jan. 2005.
- [124] C. Bouteloup, J.-C. Desport, P. Clavelou, N. Guy, H. Derumeaux-Burel, A. Ferrier, and P. Couratier, "Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon.," *J. Neurol.*, vol. 256, no. 8, pp. 1236–42, Aug. 2009.
- [125] E. J. Kasarskis, S. Berryman, J. G. Vanderleest, A. R. Schneider, and C. J. McClain, "Nutritional status of patients with amyotrophic lateral sclerosis: relation to the proximity of death.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 63, no. 1, pp. 130–7, Jan. 1996.
- [126] F. M. Menzies, P. G. Ince, and P. J. Shaw, "Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis.," *Neurochem. Int.*, vol. 40, no. 6, pp. 543–51, May 2002.
- [127] M. Fouladiun, U. Körner, L. Gunnebo, P. Sixt-Ammilon, I. Bosaeus, and K. Lundholm, "Daily physical-rest activities in relation to nutritional state, metabolism, and quality of life in cancer patients with progressive cachexia.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 21, pp. 6379–85, Nov. 2007.
- [128] C. Bing and P. Trayhurn, "Regulation of adipose tissue metabolism in cancer cachexia.," *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 11, no. 3, pp. 201–7, May 2008.
- [129] E. Lindauer, L. Dupuis, H.-P. Müller, H. Neumann, A. C. Ludolph, and J. Kassubek, "Adipose Tissue Distribution Predicts Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis.," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e67783, Jan. 2013.

- [130] V. Gallo, P. A. Wark, M. Jenab, N. Pearce, C. Brayne, R. Vermeulen, P. M. Andersen, G. Hallmans, A. Kyrozi, N. Vanacore, M. Vahdaninia, V. Grote, R. Kaaks, A. Mattiello, H. B. Bueno-de-Mesquita, P. H. Peeters, R. C. Travis, J. Petersson, O. Hansson, L. Arriola, J.-M. Jimenez-Martin, A. Tjønneland, J. Halkjær, C. Agnoli, C. Sacerdote, C. Bonet, A. Trichopoulou, D. Gavrilu, K. Overvad, E. Weiderpass, D. Palli, J. R. Quirós, R. Tumino, K.-T. Khaw, N. Wareham, A. Barricante-Gurrea, V. Fedirko, P. Ferrari, F. Clavel-Chapelon, M.-C. Boutron-Ruault, H. Boeing, M. Vigl, L. Middleton, E. Riboli, and P. Vineis, "Prediagnostic body fat and risk of death from amyotrophic lateral sclerosis: the EPIC cohort.," *Neurology*, vol. 80, no. 9, pp. 829–38, Feb. 2013.
- [131] L. Dupuis, P. Corcia, A. Fergani, J.-L. Gonzalez De Aguilar, D. Bonnefont-Rousselot, R. Bittar, D. Seilhean, J.-J. Hauw, L. Lacomblez, J.-P. Loeffler, and V. Meininger, "Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis.," *Neurology*, vol. 70, no. 13, pp. 1004–9, Mar. 2008.
- [132] L. Lacomblez, V. Doppler, I. Beucier, G. Costes, F. Salachas, A. Raisonnier, N. Le Forestier, P.-F. Pradat, E. Bruckert, and V. Meininger, "APOE: a potential marker of disease progression in ALS.," *Neurology*, vol. 58, no. 7, pp. 1112–4, Apr. 2002.
- [133] K. Okamoto, T. Kihira, T. Kondo, G. Kobashi, M. Washio, S. Sasaki, T. Yokoyama, Y. Miyake, N. Sakamoto, Y. Inaba, and M. Nagai, "Nutritional status and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan.," *Amyotroph. Lateral Scler.*, vol. 8, no. 5, pp. 300–4, Oct. 2007.
- [134] A. Jawaid, A. R. Salamone, A. M. Strutt, S. B. Murthy, M. Wheaton, E. J. McDowell, E. Simpson, S. H. Appel, M. K. York, and P. E. Schulz, "ALS disease onset may occur later in patients with pre-morbid diabetes mellitus.," *Eur. J. Neurol.*, vol. 17, no. 5, pp. 733–9, May 2010.
- [135] L. Dupuis, H. Oudart, F. René, J.-L. Gonzalez de Aguilar, and J.-P. Loeffler, "Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 30, pp. 11159–64, Jul. 2004.
- [136] B. P. Patel, A. Safdar, S. Raha, M. A. Tarnopolsky, and M. J. Hamadeh, "Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS.," *PLoS One*, vol. 5, no. 2, p. e9386, Jan. 2010.
- [137] R. M. Ahmed, M. Irish, O. Piguet, G. M. Halliday, L. M. Ittner, S. Farooqi, J. R. Hodges, and M. C. Kiernan, "Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: distinct and overlapping changes in eating behaviour and metabolism.," *Lancet. Neurol.*, vol. 15, no. 3, pp. 332–42, Mar. 2016.
- [138] M. J. Tisdale, "Molecular pathways leading to cancer cachexia.," *Physiology (Bethesda)*, vol. 20, pp. 340–8, Oct. 2005.
- [139] H. Ogiwara, S. Takahashi, Y. Kato, I. Uyama, T. Takahara, K. Kikuchi, and S. Iida, "Diminished visceral adipose tissue in cancer cachexia.," *J. Surg. Oncol.*, vol. 57, no. 2, pp. 129–33, Oct. 1994.
- [140] K. C. Fearon and T. Preston, "Body composition in cancer cachexia.," *Infusionstherapie*, vol. 17 Suppl 3, pp. 63–6, Apr. 1990.
- [141] P. Arner and D. Langin, "Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance.," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 25, no. 5, pp. 255–62, May 2014.
- [142] J. M. Argilés, J. López-Soriano, V. Almendro, S. Busquets, and F. J. López-Soriano, "Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity?," *Med. Res. Rev.*, vol. 25, no. 1, pp. 49–65, Jan. 2005.
- [143] M. J. Tisdale, "Cancer cachexia.," *Langenbeck's Arch. Surg. / Dtsch. Gesellschaft für Chir.*, vol. 389, no. 4, pp. 299–305, Aug. 2004.
- [144] S. Dessì, B. Batetta, O. Spano, G. J. Bagby, L. Tessitore, P. Costelli, F. M. Baccino, P. Pani, and J. M. Argilés, "Perturbations of triglycerides but not of cholesterol metabolism are prevented by anti-tumour necrosis factor treatment in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130).," *Br. J. Cancer*, vol. 72, no. 5, pp. 1138–43, Nov. 1995.

- [145] F. G. Shellock, M. S. Riedinger, and M. C. Fishbein, "Brown adipose tissue in cancer patients: possible cause of cancer-induced cachexia.," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 111, no. 1, pp. 82–5, Jan. 1986.
- [146] S. Halabi, S.-S. Ou, N. J. Vogelzang, and E. J. Small, "Inverse correlation between body mass index and clinical outcomes in men with advanced castration-recurrent prostate cancer.," *Cancer*, vol. 110, no. 7, pp. 1478–84, Oct. 2007.
- [147] E. Pokrishevsky, L. I. Grad, M. Yousefi, J. Wang, I. R. Mackenzie, and N. R. Cashman, "Aberrant localization of FUS and TDP43 is associated with misfolding of SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis.," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, p. e35050, Jan. 2012.
- [148] S. Boill e, C. Vande Velde, and D. W. Cleveland, "ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors.," *Neuron*, vol. 52, no. 1, pp. 39–59, Oct. 2006.
- [149] K. Yamanaka, S. J. Chun, S. Boillee, N. Fujimori-Tonou, H. Yamashita, D. H. Gutmann, R. Takahashi, H. Misawa, and D. W. Cleveland, "Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis.," *Nat. Neurosci.*, vol. 11, no. 3, pp. 251–3, Mar. 2008.
- [150] M. T. Heneka, M. J. Carson, J. El Khoury, G. E. Landreth, F. Brosseon, D. L. Feinstein, A. H. Jacobs, T. Wyss-Coray, J. Vitorica, R. M. Ransohoff, K. Herrup, S. A. Frautschy, B. Finsen, G. C. Brown, A. Verkhratsky, K. Yamanaka, J. Koistinaho, E. Latz, A. Halle, G. C. Petzold, T. Town, D. Morgan, M. L. Shinohara, V. H. Perry, C. Holmes, N. G. Bazan, D. J. Brooks, S. Hunot, B. Joseph, N. Deigendesch, O. Garaschuk, E. Boddeke, C. A. Dinarello, J. C. Breitner, G. M. Cole, D. T. Golenbock, and M. P. Kummer, "Neuroinflammation in Alzheimer's disease," *Lancet Neurol.*, vol. 14, no. 4, pp. 388–405, Apr. 2015.
- [151] O. Komine and K. Yamanaka, "Neuroinflammation in motor neuron disease.," *Nagoya J. Med. Sci.*, vol. 77, no. 4, pp. 537–549, Nov. 2015.
- [152] M. R. Turner, A. Cagnin, F. E. Turkheimer, C. C. J. Miller, C. E. Shaw, D. J. Brooks, P. N. Leigh, and R. B. Banati, "Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study.," *Neurobiol. Dis.*, vol. 15, no. 3, pp. 601–9, Apr. 2004.
- [153] P. Corcia, C. Tauber, J. Vercoillie, N. Arlicot, C. Prunier, J. Praline, G. Nicolas, Y. Venel, C. Hommet, J.-L. Baulieu, J.-P. Cottier, C. Roussel, M. Kassiou, D. Guilloteau, and M.-J. Ribeiro, "Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis.," *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e52941, Jan. 2012.
- [154] T. Kawamata, H. Akiyama, T. Yamada, and P. L. McGeer, "Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue.," *Am. J. Pathol.*, vol. 140, no. 3, pp. 691–707, Mar. 1992.
- [155] M. E. Alexianu, M. Kozovska, and S. H. Appel, "Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression.," *Neurology*, vol. 57, no. 7, pp. 1282–9, Oct. 2001.
- [156] M. Pekny and M. Nilsson, "Astrocyte activation and reactive gliosis.," *Glia*, vol. 50, no. 4, pp. 427–34, Jun. 2005.
- [157] J. D. Rothstein, M. Van Kammen, A. I. Levey, L. J. Martin, and R. W. Kuncl, "Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis.," *Ann. Neurol.*, vol. 38, no. 1, pp. 73–84, Jul. 1995.
- [158] D. S. Howland, J. Liu, Y. She, B. Goad, N. J. Maragakis, B. Kim, J. Erickson, J. Kulik, L. DeVito, G. Psaltis, L. J. DeGennaro, D. W. Cleveland, and J. D. Rothstein, "Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS).," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 3, pp. 1604–1609, Feb. 2002.
- [159] E. Ekestern, "Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis.," *Neurodegener. Dis.*, vol. 1, no. 2–3, pp. 88–100, Jan. 2004.
- [160] M. Pehar, P. Cassina, M. R. Vargas, R. Castellanos, L. Viera, J. S. Beckman, A. G.

- Estévez, and L. Barbeito, "Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis.," *J. Neurochem.*, vol. 89, no. 2, pp. 464–73, Apr. 2004.
- [161] D. Schiffer, S. Cordera, P. Cavalla, and A. Migheli, "Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis," *J. Neurol. Sci.*, vol. 139 Suppl, pp. 27–33, Aug. 1996.
- [162] J. B. Levine, J. Kong, M. Nadler, and Z. Xu, "Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS)," *Glia*, vol. 28, no. 3, pp. 215–24, Dec. 1999.
- [163] P. D. Kushner, D. T. Stephenson, and S. Wright, "Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain.," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 50, no. 3, pp. 263–77, May 1991.
- [164] D. Nagy, T. Kato, and P. D. Kushner, "Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis.," *J. Neurosci. Res.*, vol. 38, no. 3, pp. 336–47, Jun. 1994.
- [165] E. Hall, J. Oostveen, and M. Gurney, "Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS," *Glia*, 1998.
- [166] M. N. M. Hart, "Neuroinflammation: Mechanisms and Management," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 62, no. 4, pp. 427.2–427, Apr. 2003.
- [167] G.-H. Dong, M.-M. Liu, D. Wang, L. Zheng, Z.-F. Liang, and Y.-H. Jin, "Sub-chronic effect of perfluorooctanesulfonate (PFOS) on the balance of type 1 and type 2 cytokine in adult C57BL6 mice.," *Arch. Toxicol.*, vol. 85, no. 10, pp. 1235–44, Oct. 2011.
- [168] D. Papadimitriou, V. Le Verche, A. Jacquier, B. Ikiz, S. Przedborski, and D. B. Re, "Inflammation in ALS and SMA: sorting out the good from the evil.," *Neurobiol. Dis.*, vol. 37, no. 3, pp. 493–502, Mar. 2010.
- [169] H. D. Venters, R. Dantzer, and K. W. Kelley, "A new concept in neurodegeneration: TNFalpha is a silencer of survival signals.," *Trends Neurosci.*, vol. 23, no. 4, pp. 175–80, May 2000.
- [170] T. Yoshihara, S. Ishigaki, M. Yamamoto, Y. Liang, J. Niwa, H. Takeuchi, M. Doyu, and G. Sobue, "Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis.," *J. Neurochem.*, vol. 80, no. 1, pp. 158–67, Jan. 2002.
- [171] K. Hensley, J. Fedynyshyn, S. Ferrell, R. A. Floyd, B. Gordon, P. Grammas, L. Hamdheydari, M. Mhatre, S. Mou, Q. N. Pye, C. Stewart, M. West, S. West, and K. S. Williamson, "Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and TNF alpha-modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis.," *Neurobiol. Dis.*, vol. 14, no. 1, pp. 74–80, Oct. 2003.
- [172] M. Poloni, D. Facchetti, R. Mai, A. Micheli, L. Agnoletti, G. Francolini, G. Mora, C. Camana, L. Mazzini, and T. Bachetti, "Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis.," *Neurosci. Lett.*, vol. 287, no. 3, pp. 211–4, Jul. 2000.
- [173] S. Ono, J. Hu, N. Shimizu, T. Imai, and H. Nakagawa, "Increased interleukin-6 of skin and serum in amyotrophic lateral sclerosis.," *J. Neurol. Sci.*, vol. 187, no. 1–2, pp. 27–34, Jul. 2001.
- [174] M. Llovera, C. García-Martínez, J. López-Soriano, N. Agell, F. J. López-Soriano, I. Garcia, and J. M. Argilés, "Protein turnover in skeletal muscle of tumour-bearing transgenic mice overexpressing the soluble TNF receptor-1.," *Cancer Lett.*, vol. 130, no. 1–2, pp. 19–27, Aug. 1998.
- [175] G. Strassmann, M. Fong, J. S. Kenney, and C. O. Jacob, "Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia.," *J. Clin. Invest.*, vol. 89, no. 5, pp. 1681–4, May 1992.

- [176] B. Ebrahimi, S. L. Tucker, D. Li, J. L. Abbruzzese, and R. Kurzrock, "Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis," *Cancer*, vol. 101, no. 12, pp. 2727–36, Dec. 2004.
- [177] K. Kuroda, J. Nakashima, K. Kanao, E. Kikuchi, A. Miyajima, Y. Horiguchi, K. Nakagawa, M. Oya, T. Ohigashi, and M. Murai, "Interleukin 6 is associated with cachexia in patients with prostate cancer.," *Urology*, vol. 69, no. 1, pp. 113–7, Jan. 2007.
- [178] M. J. Tisdale, "Biology of cachexia.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 89, no. 23, pp. 1763–73, Dec. 1997.
- [179] P. Costelli, N. Carbó, L. Tessitore, G. J. Bagby, F. J. Lopez-Soriano, J. M. Argilés, and F. M. Baccino, "Tumor necrosis factor-alpha mediates changes in tissue protein turnover in a rat cancer cachexia model.," *J. Clin. Invest.*, vol. 92, no. 6, pp. 2783–9, Dec. 1993.
- [180] G. Strassmann, M. Fong, C. E. Freter, S. Windsor, F. D'Alessandro, and R. P. Nordan, "Suramin interferes with interleukin-6 receptor binding in vitro and inhibits colon-26-mediated experimental cancer cachexia in vivo.," *J. Clin. Invest.*, vol. 92, no. 5, pp. 2152–9, Nov. 1993.
- [181] P. Matthys, H. Heremans, G. Opdenakker, and A. Billiau, "Anti-interferon-gamma antibody treatment, growth of Lewis lung tumours in mice and tumour-associated cachexia.," *Eur. J. Cancer*, vol. 27, no. 2, pp. 182–7, Jan. 1991.
- [182] S. Acharyya, K. J. Ladner, L. L. Nelsen, J. Damrauer, P. J. Reiser, S. Swoap, and D. C. Guttridge, "Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products," *J Clin Invest*, vol. 114, no. 3, pp. 370–378, Aug. 2004.
- [183] G. S. Lynch, "Therapies for improving muscle function in neuromuscular disorders.," *Exerc. Sport Sci. Rev.*, vol. 29, no. 4, pp. 141–8, Oct. 2001.
- [184] E. M. Zinna and K. E. Yarasheski, "Exercise treatment to counteract protein wasting of chronic diseases.," *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 6, no. 1, pp. 87–93, Jan. 2003.
- [185] A. J. Cruz-Jentoft, J. P. Baeyens, J. M. Bauer, Y. Boirie, T. Cederholm, F. Landi, F. C. Martin, J.-P. Michel, Y. Rolland, S. M. Schneider, E. Topinková, M. Vandewoude, and M. Zamboni, "Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People.," *Age Ageing*, vol. 39, no. 4, pp. 412–23, Jul. 2010.
- [186] A. A. Vandervoort, "Aging of the human neuromuscular system.," *Muscle Nerve*, vol. 25, no. 1, pp. 17–25, Jan. 2002.
- [187] L. S. Krivickas, J.-I. Yang, S.-K. Kim, and W. R. Frontera, "Skeletal muscle fiber function and rate of disease progression in amyotrophic lateral sclerosis.," *Muscle Nerve*, vol. 26, no. 5, pp. 636–43, Nov. 2002.
- [188] J. Hegedus, C. T. Putman, and T. Gordon, "Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.," *Neurobiol. Dis.*, vol. 28, no. 2, pp. 154–64, Nov. 2007.
- [189] J. Hegedus, C. T. Putman, N. Tyreman, and T. Gordon, "Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.," *J. Physiol.*, vol. 586, no. 14, pp. 3337–51, Jul. 2008.
- [190] A. M. Schaefer, J. R. Sanes, and J. W. Lichtman, "A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.," *J. Comp. Neurol.*, vol. 490, no. 3, pp. 209–19, Sep. 2005.
- [191] P. S. Sharp, J. R. T. Dick, and L. Greensmith, "The effect of peripheral nerve injury on disease progression in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.," *Neuroscience*, vol. 130, no. 4, pp. 897–910, Jan. 2005.
- [192] Z. Yu, P. Li, M. Zhang, M. Hannink, J. S. Stamler, and Z. Yan, "Fiber type-specific nitric oxide protects oxidative myofibers against cachectic stimuli.," *PLoS One*, vol. 3, no. 5, p. e2086, Jan. 2008.

- [193] Z. Puthuchery, H. Montgomery, J. Moxham, S. Harridge, and N. Hart, "Structure to function: muscle failure in critically ill patients.," *J. Physiol.*, vol. 588, no. Pt 23, pp. 4641–8, Dec. 2010.
- [194] V. E. Baracos, "Management of muscle wasting in cancer-associated cachexia: understanding gained from experimental studies.," *Cancer*, vol. 92, no. 6 Suppl, pp. 1669–77, Sep. 2001.
- [195] M. Llovera, C. García-Martínez, N. Agell, F. J. López-Soriano, and J. M. Argilés, "TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 230, no. 2, pp. 238–41, Jan. 1997.
- [196] C. H. C. DeJong, S. Busquets, A. G. W. Moses, P. Schrauwen, J. A. Ross, J. M. Argiles, and K. C. H. Fearon, "Systemic inflammation correlates with increased expression of skeletal muscle ubiquitin but not uncoupling proteins in cancer cachexia.," *Oncol. Rep.*, vol. 14, no. 1, pp. 257–63, Jul. 2005.
- [197] D. J. Glass, "Signaling pathways perturbing muscle mass," *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, vol. 13, no. 3, pp. 225–229, 2010.
- [198] M. de Caestecker, "The transforming growth factor-beta superfamily of receptors.," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–11, Feb. 2004.
- [199] A. Clop, F. Marcq, H. Takeda, D. Pirottin, X. Tordoir, B. Bibé, J. Bouix, F. Caiment, J.-M. Elsen, F. Eychenne, C. Larzul, E. Laville, F. Meish, D. Milenkovic, J. Tobin, C. Charlier, and M. Georges, "A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep.," *Nat. Genet.*, vol. 38, no. 7, pp. 813–8, Jul. 2006.
- [200] S. J. Lee and A. C. McPherron, "Regulation of myostatin activity and muscle growth.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 16, pp. 9306–11, Jul. 2001.
- [201] A. C. McPherron and S. J. Lee, "Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 23, pp. 12457–61, Nov. 1997.
- [202] M. Schuelke, K. R. Wagner, L. E. Stolz, C. Hübner, T. Riebel, W. Kömen, T. Braun, J. F. Tobin, and S.-J. Lee, "Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 26, pp. 2682–8, Jun. 2004.
- [203] S. J. Lee and A. C. McPherron, "Myostatin and the control of skeletal muscle mass.," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 9, no. 5, pp. 604–7, Oct. 1999.
- [204] S.-J. Lee, "Sprinting without myostatin: a genetic determinant of athletic prowess.," *Trends Genet.*, vol. 23, no. 10, pp. 475–7, Oct. 2007.
- [205] L.-A. Whittemore, K. Song, X. Li, J. Aghajanian, M. Davies, S. Girgenrath, J. J. Hill, M. Jalenak, P. Kelley, A. Knight, R. Maylor, D. O'Hara, A. Pearson, A. Quazi, S. Ryerson, X. Y. Tan, K. N. Tomkinson, G. M. Veldman, A. Widom, J. F. Wright, S. Wudyka, L. Zhao, and N. M. Wolfman, "Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 300, no. 4, pp. 965–71, Jan. 2003.
- [206] E. Latres, J. Pangilinan, L. Miloscio, R. Bauerlein, E. Na, T. B. Potocky, Y. Huang, M. Eckersdorff, A. Rafique, J. Mastaitis, C. Lin, A. J. Murphy, G. D. Yancopoulos, J. Gromada, and T. Stitt, "Myostatin blockade with a fully human monoclonal antibody induces muscle hypertrophy and reverses muscle atrophy in young and aged mice.," *Skelet. Muscle*, vol. 5, p. 34, Jan. 2015.
- [207] S. Welle, K. Bhatt, C. A. Pinkert, R. Tawil, and C. A. Thornton, "Muscle growth after postdevelopmental myostatin gene knockout.," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 292, no. 4, pp. E985–91, Apr. 2007.
- [208] M. I. Elashry, A. Otto, A. Matsakas, S. E. El-Morsy, L. Jones, B. Anderson, and K. Patel, "Axon and muscle spindle hyperplasia in the myostatin null mouse.," *J. Anat.*, vol. 218, no. 2, pp. 173–84, Feb. 2011.
- [209] S. Gay, E. Jublanc, A. Bonnieu, and F. Bacou, "Myostatin deficiency is associated with

- an increase in number of total axons and motor axons innervating mouse tibialis anterior muscle.," *Muscle Nerve*, vol. 45, no. 5, pp. 698–704, May 2012.
- [210] E. L. F. Holzbaur, D. S. Howland, N. Weber, K. Wallace, Y. She, S. Kwak, L. a. Tchistiakova, E. Murphy, J. Hinson, R. Karim, X. Y. Tan, P. Kelley, K. C. McGill, G. Williams, C. Hobbs, P. Doherty, M. M. Zaleska, M. N. Pangalos, and F. S. Walsh, "Myostatin inhibition slows muscle atrophy in rodent models of amyotrophic lateral sclerosis.," *Neurobiol. Dis.*, vol. 23, no. 3, pp. 697–707, Sep. 2006.
- [211] T. A. Zimmers, M. V Davies, L. G. Koniaris, P. Haynes, A. F. Esquela, K. N. Tomkinson, A. C. McPherron, N. M. Wolfman, and S.-J. Lee, "Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin.," *Science*, vol. 296, no. 5572, pp. 1486–8, May 2002.
- [212] J. Heineke, M. Auger-Messier, J. Xu, M. Sargent, A. York, S. Welle, and J. D. Molkentin, "Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure.," *Circulation*, vol. 121, no. 3, pp. 419–25, Jan. 2010.
- [213] C.-M. Liu, Z. Yang, C.-W. Liu, R. Wang, P. Tien, R. Dale, and L.-Q. Sun, "Myostatin antisense RNA-mediated muscle growth in normal and cancer cachexia mice.," *Gene Ther.*, vol. 15, no. 3, pp. 155–60, Feb. 2008.
- [214] H. Amthor, G. Nicholas, I. McKinnell, C. F. Kemp, M. Sharma, R. Kambadur, and K. Patel, "Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis.," *Dev. Biol.*, vol. 270, no. 1, pp. 19–30, Jun. 2004.
- [215] T. M. Miller, S. H. Kim, K. Yamanaka, M. Hester, P. Umapathi, H. Arnson, L. Rizo, J. R. Mendell, F. H. Gage, D. W. Cleveland, and B. K. Kaspar, "Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 51, pp. 19546–51, Dec. 2006.
- [216] P. Costelli, M. Muscaritoli, A. Bonetto, F. Penna, P. Reffo, M. Bossola, G. Bonelli, G. B. Doglietto, F. M. Baccino, and F. Rossi Fanelli, "Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia.," *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 38, no. 7, pp. 531–8, Jul. 2008.
- [217] S.-J. Lee, L. A. Reed, M. V Davies, S. Girgenrath, M. E. P. Goad, K. N. Tomkinson, J. F. Wright, C. Barker, G. Ehrmantraut, J. Holmstrom, B. Trowell, B. Gertz, M.-S. Jiang, S. M. Sebald, M. Matzuk, E. Li, L.-F. Liang, E. Quattlebaum, R. L. Stotish, and N. M. Wolfman, "Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 50, pp. 18117–22, Dec. 2005.
- [218] S. P. Oh and E. Li, "The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse.," *Genes Dev.*, vol. 11, no. 14, pp. 1812–26, Jul. 1997.
- [219] B. M. Morrison, J. L. Lachey, L. C. Warsing, B. L. Ting, A. E. Pullen, K. W. Underwood, R. Kumar, D. Sako, A. Grinberg, V. Wong, E. Colantuoni, J. S. Seehra, and K. R. Wagner, "A soluble activin type IIB receptor improves function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.," *Exp. Neurol.*, vol. 217, no. 2, pp. 258–68, Jun. 2009.
- [220] X. Zhou, J. L. Wang, J. Lu, Y. Song, K. S. Kwak, Q. Jiao, R. Rosenfeld, Q. Chen, T. Boone, W. S. Simonet, D. L. Lacey, A. L. Goldberg, and H. Q. Han, "Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival.," *Cell*, vol. 142, no. 4, pp. 531–43, Aug. 2010.
- [221] E. Lach-Trifilieff, G. C. Minetti, K. Sheppard, C. Ibebunjo, J. N. Feige, S. Hartmann, S. Brachat, H. Rivet, C. Koelbing, F. Morvan, S. Hatakeyama, and D. J. Glass, "An antibody blocking activin type II receptors induces strong skeletal muscle hypertrophy and protects from atrophy.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 34, no. 4, pp. 606–18, Feb. 2014.
- [222] R. C. Smith and B. K. Lin, "Myostatin inhibitors as therapies for muscle wasting associated with cancer and other disorders.," *Curr. Opin. Support. Palliat. Care*, vol. 7, no. 4, pp. 352–60, Dec. 2013.
- [223] L. R. Rodino-Klapac, A. M. Haidet, J. Kota, C. Handy, B. K. Kaspar, and J. R. Mendell,

- "Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease.," *Muscle Nerve*, vol. 39, no. 3, pp. 283–96, Mar. 2009.
- [224] B. Langley, M. Thomas, A. Bishop, M. Sharma, S. Gilmour, and R. Kambadur, "Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 51, pp. 49831–40, Dec. 2002.
- [225] A. U. Trendelenburg, A. Meyer, D. Rohner, J. Boyle, S. Hatakeyama, and D. J. Glass, "Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 296, no. 6, pp. C1258–70, Jun. 2009.
- [226] A. Amirouche, A.-C. Durieux, S. Banzet, N. Koulmann, R. Bonnefoy, C. Mouret, X. Bigard, A. Peinnequin, and D. Freyssenet, "Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle.," *Endocrinology*, vol. 150, no. 1, pp. 286–94, Jan. 2009.
- [227] C. McFarlane, E. Plummer, M. Thomas, A. Hennebry, M. Ashby, N. Ling, H. Smith, M. Sharma, and R. Kambadur, "Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 209, no. 2, pp. 501–14, Nov. 2006.
- [228] D. J. Glass, "Signaling pathways perturbing muscle mass," *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, vol. 13, no. 3, pp. 225–229, May 2010.
- [229] D. J. Glass, "Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 37, no. 10, pp. 1974–84, Oct. 2005.
- [230] M. Sandri, C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, A. Picard, K. Walsh, S. Schiaffino, S. H. Lecker, and A. L. Goldberg, "Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy.," *Cell*, vol. 117, no. 3, pp. 399–412, Apr. 2004.
- [231] D. S. Waddell, L. M. Baehr, J. van den Brandt, S. A. Johnsen, H. M. Reichardt, J. D. Furlow, and S. C. Bodine, "The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene.," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 295, no. 4, pp. E785–97, Oct. 2008.
- [232] C. Mammucari, G. Milan, V. Romanello, E. Masiero, R. Rudolf, P. Del Piccolo, S. J. Burden, R. Di Lisi, C. Sandri, J. Zhao, A. L. Goldberg, S. Schiaffino, and M. Sandri, "FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo.," *Cell Metab.*, vol. 6, no. 6, pp. 458–71, Dec. 2007.
- [233] Y. Yamazaki, Y. Kamei, S. Sugita, F. Akaike, S. Kanai, S. Miura, Y. Hirata, B. R. Troen, T. Kitamura, I. Nishino, T. Suganami, O. Ezaki, and Y. Ogawa, "The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle.," *Biochem. J.*, vol. 427, no. 1, pp. 171–8, Apr. 2010.
- [234] Y. Kamei, S. Miura, M. Suzuki, Y. Kai, J. Mizukami, T. Taniguchi, K. Mochida, T. Hata, J. Matsuda, H. Aburatani, I. Nishino, and O. Ezaki, "Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 39, pp. 41114–23, Sep. 2004.
- [235] C.-M. Liu, Z. Yang, C.-W. Liu, R. Wang, P. Tien, R. Dale, and L.-Q. Sun, "Effect of RNA oligonucleotide targeting Foxo-1 on muscle growth in normal and cancer cachexia mice.," *Cancer Gene Ther.*, vol. 14, no. 12, pp. 945–52, Dec. 2007.
- [236] S. A. Reed, P. B. Sandesara, S. M. Senf, and A. R. Judge, "Inhibition of FoxO transcriptional activity prevents muscle fiber atrophy during cachexia and induces hypertrophy," *Faseb J*, vol. 26, no. 3, pp. 987–1000, Mar. 2012.
- [237] S. C. Bodine, T. N. Stitt, M. Gonzalez, W. O. Kline, G. L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, A. Scrimgeour, J. C. Lawrence, D. J. Glass, and G. D. Yancopoulos, "Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. 11, pp. 1014–9, Nov. 2001.
- [238] R. J. Shaw, "LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and

- growth.," *Acta Physiol. (Oxf)*., vol. 196, no. 1, pp. 65–80, May 2009.
- [239] D. G. Hardie, "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 10, pp. 774–785, Oct. 2007.
- [240] E. L. Greer, P. R. Oskoui, M. R. Banko, J. M. Maniar, M. P. Gygi, S. P. Gygi, and A. Brunet, "The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 41, pp. 30107–30119, Oct. 2007.
- [241] J. Zhao, J. J. Brault, A. Schild, P. Cao, M. Sandri, S. Schiaffino, S. H. Lecker, and A. L. Goldberg, "FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells," *Cell Metab.*, vol. 6, no. 6, pp. 472–83, Dec. 2007.
- [242] K.-M. V. Lai, M. Gonzalez, W. T. Poueymirou, W. O. Kline, E. Na, E. Zlotchenko, T. N. Stitt, A. N. Economides, G. D. Yancopoulos, and D. J. Glass, "Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 21, pp. 9295–304, Nov. 2004.
- [243] X.-D. Peng, P.-Z. Xu, M.-L. Chen, A. Hahn-Windgassen, J. Skeen, J. Jacobs, D. Sundararajan, W. S. Chen, S. E. Crawford, K. G. Coleman, and N. Hay, "Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2.," *Genes Dev.*, vol. 17, no. 11, pp. 1352–65, Jun. 2003.
- [244] G. Dobrowolny, M. Aucello, and A. Musarò, "Muscle atrophy induced by SOD1G93A expression does not involve the activation of caspase in the absence of denervation.," *Skelet. Muscle*, vol. 1, no. 1, p. 3, Jan. 2011.
- [245] F. Yin, F. Ye, L. Tan, K. Liu, Z. Xuan, J. Zhang, W. Wang, Y. Zhang, X. Jiang, and D. Y. Zhang, "Alterations of signaling pathways in muscle tissues of patients with amyotrophic lateral sclerosis.," *Muscle Nerve*, vol. 46, no. 6, pp. 861–70, Dec. 2012.
- [246] M. Galbiati, V. Crippa, P. Rusmini, R. Cristofani, M. E. Cicardi, E. Giorgetti, E. Onesto, E. Messi, and A. Poletti, "ALS-related misfolded protein management in motor neurons and muscle cells.," *Neurochem. Int.*, vol. 79, pp. 70–8, Dec. 2014.
- [247] S. A. Reed, P. B. Sandesara, S. M. Senf, and A. R. Judge, "Inhibition of FoxO transcriptional activity prevents muscle fiber atrophy during cachexia and induces hypertrophy," *Faseb J*, vol. 26, no. 3, pp. 987–1000, 2012.
- [248] E. W. Cornwell, A. Mirbod, C. L. Wu, S. C. Kandarian, and R. W. Jackman, "C26 cancer-induced muscle wasting is IKKbeta-dependent and NF-kappaB-independent," *PLoS One*, vol. 9, no. 1, p. e87776, 2014.
- [249] A. Skorokhod, J. Bachmann, N. A. Giese, M. E. Martignoni, and H. Krakowski-Roosen, "Real-imaging cDNA-AFLP transcript profiling of pancreatic cancer patients: Egr-1 as a potential key regulator of muscle cachexia," *BMC Cancer*, vol. 12, p. 265, 2012.
- [250] M. H. Glickman and A. Ciechanover, "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction.," *Physiol. Rev.*, vol. 82, no. 2, pp. 373–428, Apr. 2002.
- [251] M. D. Marmor and Y. Yarden, "Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases," *Oncogene*, vol. 23, no. 11, pp. 2057–2070, Mar. 2004.
- [252] V. Chau, J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. J. Ecker, D. K. Gonda, and A. Varshavsky, "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein," *Science (80-.)*, vol. 243, no. 4898, pp. 1576–1583, Mar. 1989.
- [253] L. A. Passmore and D. Barford, "Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation," *Biochem J*, vol. 379, no. Pt 3, pp. 513–525, 2004.
- [254] D. Attaix, S. Ventadour, A. Codran, D. Bechet, D. Taillandier, and L. Combaret, "The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting," *Essays Biochem*, vol. 41, pp. 173–186, 2005.

- [255] S. C. Bodine, E. Latres, S. Baumhueter, V. K. Lai, L. Nunez, B. A. Clarke, W. T. Poueymirou, F. J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z. Q. Pan, D. M. Valenzuela, T. M. DeChiara, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos, and D. J. Glass, "Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy," *Science (80-.)*, vol. 294, no. 5547, pp. 1704–1708, 2001.
- [256] M. D. Gomes, S. H. Lecker, R. T. Jagoe, A. Navon, and A. L. Goldberg, "Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 25, pp. 14440–14445, 2001.
- [257] T. Centner, J. Yano, E. Kimura, A. S. McElhinny, K. Pelin, C. C. Witt, M. L. Bang, K. Trombitas, H. Granzier, C. C. Gregorio, H. Sorimachi, and S. Labeit, "Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain," *J Mol Biol*, vol. 306, no. 4, pp. 717–726, Mar. 2001.
- [258] L. A. Tintignac, J. Lagirand, S. Batonnet, V. Sirri, M. P. Leibovitch, and S. A. Leibovitch, "Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase," *J Biol Chem*, vol. 280, no. 4, pp. 2847–2856, 2005.
- [259] J. Lagirand-Cantaloube, N. Offner, A. Csibi, M. P. Leibovitch, S. Batonnet-Pichon, L. A. Tintignac, C. T. Segura, and S. A. Leibovitch, "The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy," *Embo J*, vol. 27, no. 8, pp. 1266–1276, 2008.
- [260] A. S. McElhinny, K. Kakinuma, H. Sorimachi, S. Labeit, and C. C. Gregorio, "Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1," *J Cell Biol*, vol. 157, no. 1, pp. 125–136, 2002.
- [261] B. A. Clarke, D. Drujan, M. S. Willis, L. O. Murphy, R. A. Corpina, E. Burova, S. V. Rakhilin, T. N. Stitt, C. Patterson, E. Latres, and D. J. Glass, "The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle.," *Cell Metab.*, vol. 6, no. 5, pp. 376–85, Nov. 2007.
- [262] S. Cohen, J. J. Brault, S. P. Gygi, D. J. Glass, D. M. Valenzuela, C. Gartner, E. Latres, and A. L. Goldberg, "During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation," *J Cell Biol*, vol. 185, no. 6, pp. 1083–1095, 2009.
- [263] E. Kudryashova, D. Kudryashov, I. Kramerova, and M. J. Spencer, "Trim32 is a ubiquitin ligase mutated in limb girdle muscular dystrophy type 2H that binds to skeletal muscle myosin and ubiquitinates actin," *J Mol Biol*, vol. 354, no. 2, pp. 413–424, 2005.
- [264] J. Ye, Y. Zhang, J. Xu, Q. Zhang, and D. Zhu, "FBXO40, a gene encoding a novel muscle-specific F-box protein, is upregulated in denervation-related muscle atrophy," *Gene*, vol. 404, no. 1–2, pp. 53–60, 2007.
- [265] J. Shi, L. Luo, J. Eash, C. Ibebunjo, and D. J. Glass, "The SCF-Fbxo40 complex induces IRS1 ubiquitination in skeletal muscle, limiting IGF1 signaling," *Dev Cell*, vol. 21, no. 5, pp. 835–847, 2011.
- [266] P. K. Paul, S. K. Gupta, S. Bhatnagar, S. K. Panguluri, B. G. Darnay, Y. Choi, and A. Kumar, "Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice," *J Cell Biol*, vol. 191, no. 7, pp. 1395–1411, 2010.
- [267] R. Sartori, E. Schirwis, B. Blaauw, S. Bortolanza, J. Zhao, E. Enzo, A. Stantzou, E. Mouisel, L. Toniolo, A. Ferry, S. Stricker, A. L. Goldberg, S. Dupont, S. Piccolo, H. Amthor, and M. Sandri, "BMP signaling controls muscle mass.," *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 11, pp. 1309–18, Nov. 2013.
- [268] G. Milan, V. Romanello, F. Pescatore, A. Armani, J.-H. Paik, L. Frasson, A. Seydel, J. Zhao, R. Abraham, A. L. Goldberg, B. Blaauw, R. A. DePinho, and M. Sandri, "Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy.," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 6670, Jan. 2015.
- [269] S. M. Judge, C.-L. Wu, A. W. Beharry, B. M. Roberts, L. F. Ferreira, S. C. Kandarian,

- and A. R. Judge, "Genome-wide identification of FoxO-dependent gene networks in skeletal muscle during C26 cancer cachexia.," *BMC Cancer*, vol. 14, p. 997, Jan. 2014.
- [270] J. Adams, "The proteasome: structure, function, and role in the cell.," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 29 Suppl 1, pp. 3–9, May 2003.
- [271] M. J. Tisdale, "Biochemical mechanisms of cellular catabolism.," *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 5, no. 4, pp. 401–5, Jul. 2002.
- [272] S. Murata, H. Yashiroda, and K. Tanaka, "Molecular mechanisms of proteasome assembly," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 2, pp. 104–115, Feb. 2009.
- [273] M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, and R. Huber, "Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution.," *Nature*, vol. 386, no. 6624, pp. 463–71, Apr. 1997.
- [274] M. Watanabe, M. Dykes-Hoberg, V. C. Culotta, D. L. Price, P. C. Wong, and J. D. Rothstein, "Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues.," *Neurobiol. Dis.*, vol. 8, no. 6, pp. 933–41, Dec. 2001.
- [275] D. M. F. Mendonça, L. Chimelli, and A. M. B. Martinez, "Expression of ubiquitin and proteasome in motorneurons and astrocytes of spinal cords from patients with amyotrophic lateral sclerosis.," *Neurosci. Lett.*, vol. 404, no. 3, pp. 315–9, Sep. 2006.
- [276] C. Bendotti, M. Marino, C. Cheroni, E. Fontana, V. Crippa, A. Poletti, and S. De Biasi, "Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: implication for protein aggregation and immune response.," *Prog. Neurobiol.*, vol. 97, no. 2, pp. 101–26, May 2012.
- [277] M. Galbiati, E. Onesto, A. Zito, V. Crippa, P. Rusmini, R. Mariotti, M. Bentivoglio, C. Bendotti, and A. Poletti, "The anabolic/androgenic steroid nandrolone exacerbates gene expression modifications induced by mutant SOD1 in muscles of mice models of amyotrophic lateral sclerosis.," *Pharmacol. Res.*, vol. 65, no. 2, pp. 221–30, Feb. 2012.
- [278] M. Llovera, C. García-Martínez, N. Agell, M. Marzábal, F. J. López-Soriano, and J. M. Argilés, "Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumour-bearing rats.," *FEBS Lett.*, vol. 338, no. 3, pp. 311–8, Feb. 1994.
- [279] V. E. Baracos, C. DeVivo, D. H. Hoyle, and A. L. Goldberg, "Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma.," *Am. J. Physiol.*, vol. 268, no. 5 Pt 1, pp. E996–1006, May 1995.
- [280] P. Costelli, M. Muscaritoli, M. Bossola, F. Penna, P. Reffo, A. Bonetto, S. Busquets, G. Bonelli, F. J. Lopez-Soriano, G. B. Doglietto, J. M. Argilés, F. M. Baccino, and F. Rossi Fanelli, "IGF-1 is downregulated in experimental cancer cachexia.," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 291, no. 3, pp. R674–83, Sep. 2006.
- [281] R. A. Siddiqui, S. Hassan, K. A. Harvey, T. Rasool, T. Das, P. Mukerji, and S. DeMichele, "Attenuation of proteolysis and muscle wasting by curcumin c3 complex in MAC16 colon tumour-bearing mice.," *Br. J. Nutr.*, vol. 102, no. 7, pp. 967–75, Oct. 2009.
- [282] M. L. Asp, M. Tian, A. A. Wendel, and M. A. Belury, "Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice.," *Int. J. cancer*, vol. 126, no. 3, pp. 756–63, Feb. 2010.
- [283] I. J. Gallagher, N. A. Stephens, A. J. MacDonald, R. J. E. Skipworth, H. Husi, C. A. Greig, J. A. Ross, J. A. Timmons, and K. C. H. Fearon, "Suppression of skeletal muscle turnover in cancer cachexia: evidence from the transcriptome in sequential human muscle biopsies.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 10, pp. 2817–27, May 2012.
- [284] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.," *Br. J. Cancer*, vol. 26, no. 4, pp. 239–57, Aug. 1972.
- [285] M. Cikala, B. Wilm, E. Hobmayer, A. Böttger, and C. N. David, "Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra.," *Curr. Biol.*, vol. 9, no. 17, pp. 959–62, Sep. 1999.

- [286] J. Yuan, S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis, and H. R. Horvitz, "The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme.," *Cell*, vol. 75, no. 4, pp. 641–52, Nov. 1993.
- [287] D. W. Nicholson, "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death.," *Cell Death Differ.*, vol. 6, no. 11, pp. 1028–42, Nov. 1999.
- [288] E. M. Creagh, H. Conroy, and S. J. Martin, "Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity.," *Immunol. Rev.*, vol. 193, pp. 10–21, Jun. 2003.
- [289] A. Ashkenazi and V. M. Dixit, "Death receptors: signaling and modulation.," *Science*, vol. 281, no. 5381, pp. 1305–8, Aug. 1998.
- [290] M. Muzio, A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter, and V. M. Dixit, "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex.," *Cell*, vol. 85, no. 6, pp. 817–27, Jun. 1996.
- [291] S. A. Lakhani, A. Masud, K. Kuida, G. A. Porter, C. J. Booth, W. Z. Mehal, I. Inayat, and R. A. Flavell, "Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis.," *Science*, vol. 311, no. 5762, pp. 847–51, Feb. 2006.
- [292] T. Koseki, N. Inohara, S. Chen, and G. Núñez, "ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 9, pp. 5156–60, Apr. 1998.
- [293] N. N. Danial and S. J. Korsmeyer, "Cell death: critical control points.," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 205–19, Jan. 2004.
- [294] P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, and X. Wang, "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.," *Cell*, vol. 91, no. 4, pp. 479–89, Nov. 1997.
- [295] E. E. Dupont-Versteegden, "Apoptosis in muscle atrophy: relevance to sarcopenia.," *Exp. Gerontol.*, vol. 40, no. 6, pp. 473–81, Jun. 2005.
- [296] W. A. He, F. Calore, P. Londhe, A. Canella, D. C. Guttridge, and C. M. Croce, "Microvesicles containing miRNAs promote muscle cell death in cancer cachexia via TLR7.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 12, pp. 4525–9, Mar. 2014.
- [297] J. E. Belizário, M. J. Lorite, and M. J. Tisdale, "Cleavage of caspases-1, -3, -6, -8 and -9 substrates by proteases in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia.," *Br. J. Cancer*, vol. 84, no. 8, pp. 1135–40, Apr. 2001.
- [298] D. J. Klionsky, "Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 11, pp. 931–7, Nov. 2007.
- [299] N. Mizushima, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, "Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 35, no. 5, pp. 553–61, May 2003.
- [300] D. J. Klionsky and S. D. Emr, "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation.," *Science*, vol. 290, no. 5497, pp. 1717–21, Dec. 2000.
- [301] Z. Yang and D. J. Klionsky, "Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 22, no. 2, pp. 124–131, Apr. 2010.
- [302] C. He, M. Baba, Y. Cao, and D. J. Klionsky, "Self-interaction is critical for Atg9 transport and function at the phagophore assembly site during autophagy.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, no. 12, pp. 5506–16, Dec. 2008.
- [303] X. H. Liang, J. Yu, K. Brown, and B. Levine, "Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function.," *Cancer Res.*, vol. 61, no. 8, pp. 3443–9, Apr. 2001.
- [304] N. Mizushima, T. Noda, T. Yoshimori, Y. Tanaka, T. Ishii, M. D. George, D. J. Klionsky, M. Ohsumi, and Y. Ohsumi, "A protein conjugation system essential for autophagy.," *Nature*, vol. 395, no. 6700, pp. 395–8, Sep. 1998.

- [305] Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing.," *EMBO J.*, vol. 19, no. 21, pp. 5720–8, Nov. 2000.
- [306] M. Aucello, G. Dobrowolny, and A. Musarò, "Localized accumulation of oxidative stress causes muscle atrophy through activation of an autophagic pathway," *Autophagy*, vol. 5, no. 4, pp. 527–529, Nov. 2014.
- [307] S. Schiaffino and V. Hanzlíková, "Studies on the effect of denervation in developing muscle. II. The lysosomal system.," *J. Ultrastruct. Res.*, vol. 39, no. 1, pp. 1–14, Apr. 1972.
- [308] V. Crippa, A. Boncoraglio, M. Galbiati, T. Aggarwal, P. Rusmini, E. Giorgetti, R. Cristofani, S. Carra, M. Pennuto, and A. Poletti, "Differential autophagy power in the spinal cord and muscle of transgenic ALS mice.," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, p. 234, Jan. 2013.
- [309] F. Penna, D. Costamagna, F. Pin, A. Camperi, A. Fanzani, E. M. Chiarpotto, G. Cavallini, G. Bonelli, F. M. Baccino, and P. Costelli, "Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia.," *Am. J. Pathol.*, vol. 182, no. 4, pp. 1367–78, Apr. 2013.
- [310] V. Musolino, S. Palus, A. Tschirner, C. Drescher, M. Gliozzi, C. Carresi, C. Vitale, C. Muscoli, W. Doehner, S. von Haehling, S. D. Anker, V. Mollace, and J. Springer, "Megestrol acetate improves cardiac function in a model of cancer cachexia-induced cardiomyopathy by autophagic modulation," *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle*, Apr. 2016.
- [311] N. Tardif, M. Klaude, L. Lundell, A. Thorell, and O. Rooyackers, "Autophagic-lysosomal pathway is the main proteolytic system modified in the skeletal muscle of esophageal cancer patients.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 98, no. 6, pp. 1485–92, Dec. 2013.
- [312] R. Fredriksson, M. C. Lagerström, L.-G. Lundin, and H. B. Schiöth, "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 63, no. 6, pp. 1256–72, Jun. 2003.
- [313] R. P. Xiao, "Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins.," *Sci. STKE*, vol. 2001, no. 104, p. re15, Oct. 2001.
- [314] A. A. Thorp and M. P. Schlaich, "Relevance of Sympathetic Nervous System Activation in Obesity and Metabolic Syndrome," *J. Diabetes Res.*, vol. 2015, pp. 1–11, Jan. 2015.
- [315] I. J. Elenkov, R. L. Wilder, G. P. Chrousos, and E. S. Vizi, "The Sympathetic Nerve—An Integrative Interface between Two Supersystems: The Brain and the Immune System," *Pharmacol. Rev.*, vol. 52, no. 4, pp. 595–638, Dec. 2000.
- [316] T. Kung, J. Springer, W. Doehner, S. D. Anker, S. von Haehling, and S. von Haehling, "Novel treatment approaches to cachexia and sarcopenia: highlights from the 5th Cachexia Conference.," *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 19, no. 4, pp. 579–585, Mar. 2010.
- [317] T. I. Barron, R. M. Connolly, L. Sharp, K. Bennett, and K. Visvanathan, "Beta blockers and breast cancer mortality: a population- based study.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 19, pp. 2635–44, Jul. 2011.
- [318] J. Springer, A. Tschirner, A. Haghikia, S. Von Haehling, H. Lal, A. Grzesiak, E. Kaschina, S. Palus, M. Pötsch, K. Von Websky, B. Hoher, C. Latouche, F. Jaisser, L. Morawietz, A. J. S. Coats, J. Beadle, J. M. Argiles, T. Thum, G. Földes, W. Doehner, D. Hilfiker-Kleiner, T. Force, and S. D. Anker, "Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure," *Eur. Heart J.*, vol. 35, no. 14, pp. 932–941, 2014.
- [319] A. M. Sharma, T. Pischon, S. Hardt, I. Kunz, and F. C. Luft, "Hypothesis: Beta-adrenergic receptor blockers and weight gain: A systematic analysis.," *Hypertension*, vol. 37, no. 2, pp. 250–4, Feb. 2001.
- [320] K. Hryniewicz, A. S. Androne, A. Hudaihed, and S. D. Katz, "Partial reversal of Cachexia

- by β -adrenergic receptor blocker therapy in patients with chronic heart failure," *J. Card. Fail.*, vol. 9, no. 6, pp. 464–468, Dec. 2003.
- [321] M. Lainscak, I. Keber, and S. D. Anker, "Body composition changes in patients with systolic heart failure treated with beta blockers: a pilot study.," *Int. J. Cardiol.*, vol. 106, no. 3, pp. 319–22, Jan. 2006.
- [322] M. S. Potsch, A. Tschirner, S. Palus, S. von Haehling, W. Doehner, J. Beadle, A. J. Coats, S. D. Anker, and J. Springer, "The anabolic catabolic transforming agent (ACTA) espidolol increases muscle mass and decreases fat mass in old rats," *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, vol. 5, no. 2, pp. 149–158, 2014.
- [323] A. J. Stewart Coats, V. Srinivasan, J. Surendran, H. Chiramana, S. R. K. G. Vangipuram, N. N. Bhatt, M. Jain, S. Shah, I. a B. H. Ali, H. G. Fuang, M. Z. M. Hassan, J. Beadle, J. Tilson, B. A. Kirwan, and S. D. Anker, "The ACT-ONE trial, a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding study of the anabolic/catabolic transforming agent, MT-102 in subjects with cachexia related to stage III and IV non-small cell lung cancer and colorectal cancer.," *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, vol. 2, no. 4, pp. 201–207, 2011.
- [324] T. Ohno, T. Shimizu, S. Kato, H. Hayashi, and S. Hirai, "Effect of tamsulosin hydrochloride on sympathetic hyperactivity in amyotrophic lateral sclerosis.," *Auton. Neurosci.*, vol. 88, no. 1–2, pp. 94–8, Apr. 2001.
- [325] P. L. Oey, P. E. Vos, G. H. Wieneke, J. H. J. Wokke, P. J. Blankestijn, and J. M. Karemaker, "Subtle involvement of the sympathetic nervous system in amyotrophic lateral sclerosis.," *Muscle Nerve*, vol. 25, no. 3, pp. 402–8, Mar. 2002.
- [326] D. J. Cordato, L. E. Mather, and G. K. Herkes, "Stereochemistry in clinical medicine: a neurological perspective.," *J. Clin. Neurosci.*, vol. 10, no. 6, pp. 649–54, Nov. 2003.
- [327] M. Meier, P. R. Hedwall, P. Imhof, M. Wilhelm, and H. Brunner, "[Optical antipodes of adrenergic beta receptor blocking agent 1-(o-allyloxyphenoxy)-3-isopropylamino-2-propanol].," *Arzneimittelforschung.*, vol. 20, no. 12, pp. 1890–6, Dec. 1970.
- [328] J. W. Black and J. S. Stephenson, "Pharmacology of a new adrenergic beta-receptor-blocking compound (Nethalide).," *Lancet (London, England)*, vol. 2, no. 7251, pp. 311–4, Aug. 1962.
- [329] M. E. Pierson, R. A. Lyon, M. Titeler, S. B. Schulman, P. Kowalski, and R. A. Glennon, "Design and synthesis of propranolol analogues as serotonergic agents.," *J. Med. Chem.*, vol. 32, no. 4, pp. 859–63, Apr. 1989.
- [330] D. W. Costain and A. R. Green, "beta-Adrenoceptor antagonists inhibit the behavioural responses of rats to increased brain 5-hydroxytryptamine.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 64, no. 2, pp. 193–200, Oct. 1978.
- [331] M. J. Reiter, "Cardiovascular drug class specificity: β -blockers," *Prog. Cardiovasc. Dis.*, vol. 47, no. 1, pp. 11–33, Jul. 2004.
- [332] T. D. Heiman-Patterson, J. S. Deitch, E. P. Blankenhorn, K. L. Erwin, M. J. Perreault, B. K. Alexander, N. Byers, I. Toman, and G. M. Alexander, "Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)1Gur mouse model of ALS," *J. Neurol. Sci.*, vol. 236, no. 1–2, pp. 1–7, Sep. 2005.
- [333] S. Scott, J. E. Kranz, J. Cole, J. M. Lincecum, K. Thompson, N. Kelly, A. Bostrom, J. Theodoss, B. M. Al-Nakhala, F. G. Vieira, J. Ramasubbu, and J. A. Heywood, "Design, power, and interpretation of studies in the standard murine model of ALS.," *Amyotroph. Lateral Scler.*, vol. 9, no. 1, pp. 4–15, Jan. 2008.
- [334] M. Leitner, S. Menzies, and C. Lutz, "Working with ALS mice: Guidelines for preclinical testing & colony management," *Jax*, pp. 1–28, 2009.
- [335] Y. Yeung and E. R. Stanley, "NIH Public Access," *Anal. Biochem.*, vol. 389, no. 1, pp. 89–91, 2010.
- [336] G. Paxinos and K. B. J. Franklin, *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, vol. 2nd. 2004.

- [337] F. Fonnum, "Recent developments in biochemical investigations of cholinergic transmission," *Brain Res.*, vol. 62, no. 2, pp. 497–507, Nov. 1973.
- [338] C. M. Jacque, C. Vinner, M. Kujas, M. Raoul, J. Racadot, and N. A. Baumann, "Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors.," *J. Neurol. Sci.*, vol. 35, no. 1, pp. 147–55, Jan. 1978.
- [339] U. Wilhelmsson, E. A. Bushong, D. L. Price, B. L. Smarr, V. Phung, M. Terada, M. H. Ellisman, and M. Pekny, "Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 46, pp. 17513–17518, Nov. 2006.
- [340] H. Mannoji, H. Yeger, and L. E. Becker, "A specific histochemical marker (lectin Ricinus communis agglutinin-1) for normal human microglia, and application to routine histopathology.," *Acta Neuropathol.*, vol. 71, no. 3–4, pp. 341–3, Jan. 1986.
- [341] V. Dubowitz, C. A. Sewry, and R. J. M. Lane, *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. Saunders Elsevier, 2007.
- [342] B. Marin, S. Arcuti, P. Jesus, G. Logroscino, M. Copetti, A. Fontana, M. Nicol, M. Raymondeau, J. C. Desport, P. M. Preux, and P. Couratier, "Population-Based Evidence that Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis Is Related to Weight Loss at Diagnosis.," *Neurodegener. Dis.*, Feb. 2016.
- [343] D. Capitanio, M. Vasso, A. Ratti, G. Grignaschi, M. Volta, M. Moriggi, C. Daleno, C. Bendotti, V. Silani, and C. Gelfi, "Molecular signatures of amyotrophic lateral sclerosis disease progression in hind and forelimb muscles of an SOD1(G93A) mouse model.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 17, no. 10, pp. 1333–50, Nov. 2012.
- [344] B. Léger, L. Vergani, G. Sorarù, P. Hespel, W. Derave, C. Gobelet, C. D'Ascenzio, C. Angelini, and A. P. Russell, "Human skeletal muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis reveals a reduction in Akt and an increase in atrogin-1.," *FASEB J.*, vol. 20, no. 3, pp. 583–585, Mar. 2006.
- [345] A. J. Stewart Coats, V. Srinivasan, J. Surendran, H. Chiramana, S. R. Vangipuram, N. N. Bhatt, M. Jain, S. Shah, I. A. Ali, H. G. Fuang, M. Z. Hassan, J. Beadle, J. Tilson, B. A. Kirwan, and S. D. Anker, "The ACT-ONE trial, a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding study of the anabolic/catabolic transforming agent, MT-102 in subjects with cachexia related to stage III and IV non-small cell lung cancer and colorectal cancer.," *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, vol. 2, no. 4, pp. 201–207, 2011.
- [346] J. D. Crane, R. Palanivel, E. P. Mottillo, A. L. Bujak, H. Wang, R. J. Ford, A. Collins, R. M. Blümer, M. D. Fullerton, J. M. Yabut, J. J. Kim, J.-E. Ghia, S. M. Hamza, K. M. Morrison, J. D. Schertzer, J. R. B. Dyck, W. I. Khan, and G. R. Steinberg, "Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis.," *Nat. Med.*, vol. 21, no. 2, pp. 166–72, Feb. 2015.
- [347] M. E. Gurney, F. B. Cutting, P. Zhai, A. Doble, C. P. Taylor, P. K. Andrus, and E. D. Hall, "Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis.," *Ann. Neurol.*, vol. 39, no. 2, pp. 147–57, Feb. 1996.
- [348] S. Jong, M. Huisman, N. Sutedia, A. Kooi, M. Visser, J. Schelhaas, Y. Schouw, J. Veldink, and L. den Berg, "Endogenous female reproductive hormones and the risk of amyotrophic lateral sclerosis," *J. Neurol.*, vol. 260, no. 2, pp. 507–512, Feb. 2013.
- [349] A. M. Barron, S. J. Fuller, G. Verdile, and R. N. Martins, "Reproductive Hormones Modulate Oxidative Stress in Alzheimer's Disease," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 8, no. 11–12, pp. 2047–2059, Nov. 2006.
- [350] R. G. Miller, J. D. Mitchell, M. Lyon, and D. H. Moore, "Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND).," *Cochrane database Syst. Rev.*, no. 2, p. CD001447, Jan. 2002.
- [351] G. Bensimon, L. Lacomblez, J. C. Delumeau, R. Bejuit, P. Truffinet, V. Meininger, and Riluzole/ALS Study Group II, "A study of riluzole in the treatment of advanced stage or elderly patients with amyotrophic lateral sclerosis.," *J. Neurol.*, vol. 249, no. 5, pp. 609–15, May 2002.

- [352] R. T. Bartus, A. Bétourné, A. Basile, B. L. Peterson, J. Glass, and N. M. Boulis, "β2-Adrenoceptor agonists as novel, safe and potentially effective therapies for Amyotrophic lateral sclerosis (ALS).," *Neurobiol. Dis.*, vol. 85, pp. 11–24, Jan. 2016.
- [353] G. S. Lynch and J. G. Ryall, "Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease.," *Physiol. Rev.*, vol. 88, no. 2, pp. 729–67, Apr. 2008.
- [354] R. Mehvar and D. R. Brocks, "Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans.," *J. Pharm. Pharm. Sci. a Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Société Can. des Sci. Pharm.*, vol. 4, no. 2, pp. 185–200.
- [355] M. E. Laethem, R. a Lefebvre, F. M. Belpaire, H. L. Vanhoe, and M. G. Bogaert, "Stereoselective pharmacokinetics of oxprenolol and its glucuronides in humans.," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 57, no. 4, pp. 419–424, 1995.
- [356] S. Pavlovic, Z. Stevic, B. Milovanovic, B. Milicic, V. Rakocevic-Stojanovic, D. Lavrnic, and S. Apostolski, "Impairment of cardiac autonomic control in patients with amyotrophic lateral sclerosis.," *Amyotroph. Lateral Scler.*, vol. 11, no. 3, pp. 272–276, 2010.
- [357] J. H. Veldink, P. R. Bär, E. A. J. Joosten, M. Otten, J. H. J. Wokke, and L. H. van den Berg, "Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS.," *Neuromuscul. Disord.*, vol. 13, no. 9, pp. 737–43, Nov. 2003.
- [358] D. Cao, G. Wu, Z. Yang, B. Zhang, Y. Jiang, Y. Han, G. He, Q. Zhuang, Y. Wang, Z. Huang, and Q. Xi, "Role of beta1-adrenoceptor in increased lipolysis in cancer cachexia.," *Cancer Sci.*, vol. 101, no. 7, pp. 1639–45, Jul. 2010.
- [359] T. Agustsson, M. Rydén, J. Hoffstedt, V. van Harmelen, A. Dicker, J. Laurencikiene, B. Isaksson, J. Permert, and P. Arner, "Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia.," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 11, pp. 5531–7, Jun. 2007.
- [360] K. Hryniewicz, A. S. Androne, A. Hudaihed, and S. D. Katz, "Partial reversal of cachexia by beta-adrenergic receptor blocker therapy in patients with chronic heart failure.," *J. Card. Fail.*, vol. 9, no. 6, pp. 464–8, Dec. 2003.
- [361] L. F. Bonewald, D. P. Kiel, T. L. Clemens, K. Esser, E. S. Orwoll, R. J. O'Keefe, and R. A. Fielding, "Forum on bone and skeletal muscle interactions: summary of the proceedings of an ASBMR workshop.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 28, no. 9, pp. 1857–65, Sep. 2013.
- [362] M. H. Edwards, C. L. Gregson, H. P. Patel, K. A. Jameson, N. C. Harvey, A. A. Sayer, E. M. Dennison, and C. Cooper, "Muscle size, strength, and physical performance and their associations with bone structure in the Hertfordshire Cohort Study.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 28, no. 11, pp. 2295–304, Nov. 2013.
- [363] R. Mancuso, J. del Valle, L. Modol, A. Martinez, A. B. Granado-Serrano, O. Ramirez-Núñez, M. Pallás, M. Portero-Otin, R. Osta, and X. Navarro, "Resveratrol improves motoneuron function and extends survival in SOD1(G93A) ALS mice.," *Neurotherapeutics*, vol. 11, no. 2, pp. 419–32, Apr. 2014.
- [364] J. N. Joyce, N. Lexow, S. J. Kim, R. Artymyshyn, S. Senzon, D. Lawrence, M. F. Cassanova, J. E. Kleinman, E. D. Bird, and A. Winokur, "Distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in human post-mortem brain: alterations in limbic regions of schizophrenics.," *Synapse*, vol. 10, no. 3, pp. 228–46, Mar. 1992.
- [365] S. Manaker, S. B. Caine, and A. Winokur, "Alterations in receptors for thyrotropin-releasing hormone, serotonin, and acetylcholine in amyotrophic lateral sclerosis.," *Neurology*, vol. 38, no. 9, pp. 1464–74, Sep. 1988.
- [366] S. Tsermentseli, P. N. Leigh, and L. H. Goldstein, "The anatomy of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: more than frontal lobe dysfunction.," *Cortex.*, vol. 48, no. 2, pp. 166–82, Feb. 2012.
- [367] Q. T. Nguyen, Y.-J. Son, J. R. Sanes, and J. W. Lichtman, "Nerve Terminals Form But Fail to Mature When Postsynaptic Differentiation Is Blocked: In Vivo Analysis Using Mammalian Nerve-Muscle Chimeras.," *J. Neurosci.*, vol. 20, no. 16, pp. 6077–6086, Aug.

- 2000.
- [368] P. W. Mantyh, S. D. Rogers, C. J. Allen, M. D. Catton, J. R. Ghilardi, L. A. Levin, J. E. Maggio, and S. R. Vigna, "Beta 2-adrenergic receptors are expressed by glia in vivo in the normal and injured central nervous system in the rat, rabbit, and human.," *J. Neurosci.*, vol. 15, no. 1 Pt 1, pp. 152–64, Jan. 1995.
- [369] J. Sutin and Y. Shao, "Resting and reactive astrocytes express adrenergic receptors in the adult rat brain.," *Brain Res. Bull.*, vol. 29, no. 3–4, pp. 277–84.
- [370] K. F. Tanaka, H. Kashima, H. Suzuki, K. Ono, and M. Sawada, "Existence of functional beta1- and beta2-adrenergic receptors on microglia.," *J. Neurosci. Res.*, vol. 70, no. 2, pp. 232–7, Oct. 2002.
- [371] J. De Keyser, N. Wilczak, R. Leta, and C. Streetland, "Astrocytes in multiple sclerosis lack beta-2 adrenergic receptors.," *Neurology*, vol. 53, no. 8, pp. 1628–33, Nov. 1999.
- [372] A. C. Lepore, B. Rauck, C. Dejea, A. C. Pardo, M. S. Rao, J. D. Rothstein, and N. J. Maragakis, "Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease.," *Nat. Neurosci.*, vol. 11, no. 11, pp. 1294–301, Nov. 2008.
- [373] L. Van Den Bosch, P. Tilkin, G. Lemmens, and W. Robberecht, "Minocycline delays disease onset and mortality in a transgenic model of ALS.," *Neuroreport*, vol. 13, no. 8, pp. 1067–70, Jun. 2002.
- [374] D. R. Beers, J. S. Henkel, Q. Xiao, W. Zhao, J. Wang, A. A. Yen, L. Siklos, S. R. McKercher, and S. H. Appel, "Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 43, pp. 16021–6, Oct. 2006.
- [375] E. C. Hirsch and S. Hunot, "Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?," *Lancet. Neurol.*, vol. 8, no. 4, pp. 382–97, Apr. 2009.
- [376] A. Jeyachandran, B. Mertens, E. A. McKissick, and C. S. Mitchell, "Type I Vs. Type II Cytokine Levels as a Function of SOD1 G93A Mouse Amyotrophic Lateral Sclerosis Disease Progression.," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 9, p. 462, 2015.
- [377] J. Ehrhart, A. J. Smith, N. Kuzmin-Nichols, T. A. Zesiewicz, I. Jahan, R. D. Shytle, S.-H. Kim, C. D. Sanberg, T. H. Vu, C. L. Gooch, P. R. Sanberg, and S. Garbuzova-Davis, "Humoral factors in ALS patients during disease progression.," *J. Neuroinflammation*, vol. 12, p. 127, Jan. 2015.
- [378] J. Eskdale, D. Kube, H. Tesch, and G. Gallagher, "Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence.," *Immunogenetics*, vol. 46, no. 2, pp. 120–8, 1997.
- [379] H. Mühl, "Pro-Inflammatory Signaling by IL-10 and IL-22: Bad Habit Stirred Up by Interferons?," *Front. Immunol.*, vol. 4, p. 18, 2013.
- [380] F. N. Lauw, D. Pajkrt, C. E. Hack, M. Kurimoto, S. J. van Deventer, and T. van der Poll, "Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia.," *J. Immunol.*, vol. 165, no. 5, pp. 2783–9, Sep. 2000.
- [381] P. Costelli, M. Bossola, M. Muscaritoli, G. Grieco, G. Bonelli, R. Bellantone, G. B. Doglietto, F. M. Baccino, and F. Rossi Fanelli, "Anticytokine treatment prevents the increase in the activity of ATP-ubiquitin- and Ca(2+)-dependent proteolytic systems in the muscle of tumour-bearing rats.," *Cytokine*, vol. 19, no. 1, pp. 1–5, Jul. 2002.
- [382] Y. S. Kim, R. D. Sainz, P. Molenaar, and R. J. Summers, "Characterization of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in rat skeletal muscles.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 42, no. 9, pp. 1783–9, Oct. 1991.
- [383] R. S. Williams, M. G. Caron, and K. Daniel, "Skeletal muscle beta-adrenergic receptors: variations due to fiber type and training.," *Am. J. Physiol.*, vol. 246, no. 2 Pt 1, pp. E160–7, Feb. 1984.
- [384] M. S. Pötsch, A. Tschirner, S. Palus, S. von Haehling, W. Doehner, J. Beadle, A. J. S.

- Coats, S. D. Anker, and J. Springer, "The anabolic catabolic transforming agent (ACTA) espidolol increases muscle mass and decreases fat mass in old rats," *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle*, vol. 5, no. 2, pp. 149–158, 2014.
- [385] A. C. McPherron, A. M. Lawler, and S. J. Lee, "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member.," *Nature*, vol. 387, no. 6628, pp. 83–90, May 1997.
- [386] B. Léger, R. Cartoni, M. Praz, S. Lamon, O. Dériaz, A. Crettenand, C. Gobelet, P. Rohmer, M. Konzelmann, F. Luthi, and A. P. Russell, "Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy.," *J. Physiol.*, vol. 576, no. Pt 3, pp. 923–33, Nov. 2006.
- [387] L. Vadlakonda, A. Dash, M. Pasupuleti, K. Anil Kumar, and P. Reddanna, "The Paradox of Akt-mTOR Interactions.," *Front. Oncol.*, vol. 3, p. 165, 2013.
- [388] D. J. Kwiatkowski and B. D. Manning, "Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways.," *Hum. Mol. Genet.*, pp. R251–8, Oct. 2005.
- [389] S. Guo, S. L. Dunn, and M. F. White, "The reciprocal stability of FOXO1 and IRS2 creates a regulatory circuit that controls insulin signaling.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 20, no. 12, pp. 3389–99, Dec. 2006.
- [390] H. Guan, L. Song, J. Cai, Y. Huang, J. Wu, J. Yuan, J. Li, and M. Li, "Sphingosine kinase 1 regulates the Akt/FOXO3a/Bim pathway and contributes to apoptosis resistance in glioma cells.," *PLoS One*, vol. 6, no. 5, p. e19946, 2011.
- [391] T. J. McLoughlin, S. M. Smith, A. D. DeLong, H. Wang, T. G. Unterman, and K. A. Esser, "FoxO1 induces apoptosis in skeletal myotubes in a DNA-binding-dependent manner.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 297, no. 3, pp. C548–55, Sep. 2009.
- [392] D. L. Allen and T. G. Unterman, "Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 292, no. 1, pp. C188–99, Jan. 2007.
- [393] K. Nakashima and Y. Yakabe, "AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes.," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 71, no. 7, pp. 1650–6, Jul. 2007.
- [394] D. G. Hardie, "AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function.," *Genes Dev.*, vol. 25, no. 18, pp. 1895–908, Sep. 2011.
- [395] D. F. Egan, D. B. Shackelford, M. M. Mihaylova, S. Gelino, R. A. Kohnz, W. Mair, D. S. Vasquez, A. Joshi, D. M. Gwinn, R. Taylor, J. M. Asara, J. Fitzpatrick, A. Dillin, B. Viollet, M. Kundu, M. Hansen, and R. J. Shaw, "Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy.," *Science*, vol. 331, no. 6016, pp. 456–61, Jan. 2011.
- [396] C. Cantó, Z. Gerhart-Hines, J. N. Feige, M. Lagouge, L. Noriega, J. C. Milne, P. J. Elliott, P. Puigserver, and J. Auwerx, "AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity.," *Nature*, vol. 458, no. 7241, pp. 1056–60, Apr. 2009.
- [397] W.-X. Ding, H.-M. Ni, W. Gao, T. Yoshimori, D. B. Stolz, D. Ron, and X.-M. Yin, "Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability.," *Am. J. Pathol.*, vol. 171, no. 2, pp. 513–24, Aug. 2007.
- [398] G. Mariño, M. Niso-Santano, E. H. Baehrecke, and G. Kroemer, "Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 2, pp. 81–94, Feb. 2014.
- [399] S. Mukhopadhyay, P. K. Panda, N. Sinha, D. N. Das, and S. K. Bhutia, "Autophagy and apoptosis: where do they meet?," *Apoptosis*, vol. 19, no. 4, pp. 555–66, Apr. 2014.
- [400] S. Oliván, A. C. Calvo, S. Gasco, M. J. Muñoz, P. Zaragoza, and R. Osta, "Time-Point Dependent Activation of Autophagy and the UPS in SOD1G93A Mice Skeletal Muscle.,"

- PLoS One*, vol. 10, no. 8, p. e0134830, Jan. 2015.
- [401] M. Konishi, L. Pelgrim, A. Tschirner, A. Baumgarten, S. von Haehling, S. Palus, W. Doehner, S. D. Anker, and J. Springer, "Febuxostat improves outcome in a rat model of cancer cachexia.," *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle*, vol. 6, no. 2, pp. 174–80, Jun. 2015.
- [402] X. H. Wang, L. Zhang, W. E. Mitch, J. M. LeDoux, J. Hu, and J. Du, "Caspase-3 cleaves specific 19 S proteasome subunits in skeletal muscle stimulating proteasome activity.," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 28, pp. 21249–57, Jul. 2010.
- [403] J. Du, X. Wang, C. Miereles, J. L. Bailey, R. Debigare, B. Zheng, S. R. Price, and W. E. Mitch, "Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions.," *J. Clin. Invest.*, vol. 113, no. 1, pp. 115–23, Jan. 2004.
- [404] M. C. Hogg, M. R. Mitchem, H.-G. König, and J. H. M. Prehn, "Caspase 6 has a protective role in SOD1(G93A) transgenic mice.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1862, no. 6, pp. 1063–73, Jun. 2016.
- [405] G. Dobrowolny, M. Aucello, E. Rizzuto, S. Beccafico, C. Mammucari, S. Boncompagni, S. Boncompagni, S. Belia, F. Wannenes, C. Nicoletti, Z. Del Prete, N. Rosenthal, M. Molinaro, F. Protasi, G. Fanò, M. Sandri, and A. Musarò, "Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity.," *Cell Metab.*, vol. 8, no. 5, pp. 425–36, Nov. 2008.
- [406] A. J. S. Coats, S. D. Anker, and J. Springer, "Oxprenolol compositions for treating cancer," no. US patent CA2906196 A1, 2014.
- [407] A. J. S. Coats, S. D. Anker, and J. Springer, "S-enantiomerically enriched compositions of beta blockers for treating amyotrophic lateral sclerosis," 2014.
- [408] J. H. Veldink, S. Kalmijn, A. H. Van der Hout, H. H. Lemmink, G. J. Groeneveld, C. Lommen, H. Scheffer, J. H. J. Wokke, and L. H. Van den Berg, "SMN genotypes producing less SMN protein increase susceptibility to and severity of sporadic ALS.," *Neurology*, vol. 65, no. 6, pp. 820–5, Sep. 2005.

6 ANHANG

Verlaufsstudie

Tabelle 31: Auswertung der Muskelgewichte in der Verlaufsstudie. Angaben als Mittelwert \pm SEM. **: $p < 0,01$ vs. ALS-Tiere 0 Tage nach Erstsymptomatik, ***: $p < 0,001$ vs. ALS-Tiere 0 Tage nach Erstsymptomatik. BAT= Braunes Fettgewebe, GC= *Musculus gastrocnemius*, TA= *Musculus tibialis anterior*, EDL= *Musculus extensor digitorum longus*.

| Tage nach Erstsymptomatik | 0 | 10 | 20 | 30 | 41 | final |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Herz [mg] | 106,5 \pm 6,2 | 120,3 \pm 4,2 | 117,1 \pm 3,4 | 121,7 \pm 3,3 | 114,4 \pm 3,5 | 100,5 \pm 3,4 |
| BAT [mg] | 56,0 \pm 6,7 | 50,9 \pm 3,4 | 69,5 \pm 4,6 | 57,2 \pm 4,9 | 59,6 \pm 3,1 | 41,2 \pm 2,4* |
| GC [mg] | 91,9 \pm 5,2 | 79,9 \pm 5,3 | 90,2 \pm 7,4 | 74,2 \pm 6,6 | 53,2 \pm 4*** | 47,7 \pm 3*** |
| Soleus [mg] | 7,5 \pm 0,4 | 8,3 \pm 0,3 | 7,5 \pm 0,4 | 7,9 \pm 0,7 | 7,1 \pm 0,4 | 5,7 \pm 0,3** |
| TA [mg] | 29,9 \pm 2,3 | 29,8 \pm 1,6 | 31,2 \pm 2,0 | 32,3 \pm 2,3 | 27,4 \pm 1,6 | 22,8 \pm 1,1* |
| EDL [mg] | 8,2 \pm 0,5 | 9,3 \pm 0,5 | 8,8 \pm 0,7 | 8,3 \pm 0,6 | 7,9 \pm 0,4* | 6,9 \pm 0,2*** |

Vergleichsstudie

Tabelle 32: Ergebnisse der Western Blot-Analysen bezüglich der Myostatin-Signalkaskade vom GC in der Vergleichsstudie. Gruppen: WT, Placebo, Rilutek (30 mg/kg/d), R-Oxprenolol (20 mg/kg/d) und S-Oxprenolol (10 mg/kg/d, 20 mg/kg/d). Ergebnisse sind als relative Werte angegeben. Angaben als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. Placebo, **: $p < 0,01$ vs. Placebo, ***: $p < 0,001$ vs. Placebo. Plac.= Placebo, Ril.=Rilutek, Ox.= Oxprenolol.

| Gruppe [mg/kg/d] | WT | Plac. | Ril. [30] | R-Ox. [20] | S-Ox. [10] | S-Ox. [20] |
|--------------------------|--------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Männchen+Weibchen | | | | | | |
| Anzahl [n] | 12 | 10 | 10 | 9 | 9 | 9 |
| Myost. 52 kDa | 0,55 \pm 0,08** | 1,00 \pm 0,11 | 1,03 \pm 0,13 | 0,73 \pm 0,11 | 0,74 \pm 0,09 | 0,61 \pm 0,07** |
| Myost. 26 kDa | 0,23 \pm 0,04*** | 1,00 \pm 0,19 | 1,19 \pm 0,19 | 0,76 \pm 0,09 | 0,72 \pm 0,10 | 0,84 \pm 0,14 |
| Anzahl [n] | 12 | 10 | 9 | 9 | 9 | 10 |
| Follistatin | 0,28 \pm 0,06** | 1,00 \pm 0,34 | 1,15 \pm 0,27 | 1,42 \pm 0,32 | 1,15 \pm 0,22 | 0,76 \pm 0,04 |
| Anzahl [n] | 10 | 8 | 10 | 9 | 9 | 10 |
| ActRIIB | 0,58 \pm 0,14 | 1,00 \pm 0,25 | 1,08 \pm 0,09 | 0,92 \pm 0,16 | 0,98 \pm 0,11 | 1,14 \pm 0,11 |
| Anzahl [n] | 11 | 10 | 10 | 9 | 10 | 10 |
| pSMAD2 | 0,65 \pm 0,06 | 1,00 \pm 0,22 | 0,73 \pm 0,09 | 1,13 \pm 0,15 | 0,71 \pm 0,06 | 0,80 \pm 0,05 |
| Männchen | | | | | | |
| Anzahl [n] | 6 | 5 | 5 | 4 | 4 | 5 |
| Myost. 52 kDa | 0,35 \pm 0,03** | 1,00 \pm 0,23 | 0,95 \pm 0,25 | 0,48 \pm 0,03* | 0,58 \pm 0,07 | 0,53 \pm 0,04* |
| Myost. 26 kDa | 0,25 \pm 0,04** | 1,00 \pm 0,26 | 2,76 \pm 0,53* | 1,11 \pm 0,17 | 1,49 \pm 0,40 | 1,80 \pm 0,45 |
| Anzahl [n] | 6 | 5 | 4 | 4 | 4 | 5 |
| Follistatin | 0,39 \pm 0,06* | 1,00 \pm 0,30 | 1,10 \pm 0,29 | 1,31 \pm 0,04 | 1,62 \pm 0,30 | 1,50 \pm 0,11 |
| Anzahl [n] | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| ActRIIB | 0,61 \pm 0,36 | 1,00 \pm 0,62 | 1,89 \pm 0,28 | 2,42 \pm 0,09 | 1,98 \pm 0,35 | 2,50 \pm 0,39 |
| Anzahl [n] | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 |
| pSMAD2 | 0,46 \pm 0,06* | 1,00 \pm 0,28 | 0,51 \pm 0,11 | 0,55 \pm 0,04* | 0,50 \pm 0,03** | 0,53 \pm 0,04* |

| Weibchen | WT | Plac. | Ril. [30] | R-Ox. [20] | S-Ox. [10] | S-Ox. [20] |
|---------------|-------------|-----------|-----------|-------------|-------------|------------|
| Anzahl [n] | 6 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 |
| Myost. 52 kDa | 0,68±0,03** | 1,00±0,06 | 1,08±0,08 | 0,84±0,07 | 0,81±0,05* | 0,69±0,01* |
| Myost. 26 kDa | 0,23±0,02** | 1,00±0,13 | 0,62±0,14 | 0,61±0,08 | 0,45±0,05** | 0,47±0,09* |
| Anzahl [n] | 6 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Follistatin | 0,25±0,07* | 1,00±0,39 | 1,09±0,20 | 1,35±0,24 | 0,95±0,22 | 0,53±0,04 |
| Anzahl [n] | 5 | 4 | 5 | 4 | 4 | 5 |
| ActRIIB | 0,56±0,09 | 1,00±0,11 | 0,80±0,07 | 0,34±0,16 | 0,62±0,07 | 0,68±0,06 |
| Anzahl [n] | 6 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| pSMAD2 | 1,03±0,15 | 1,00±0,19 | 1,18±0,17 | 2,20±0,26** | 1,13±0,18 | 1,37±0,10 |

Tabelle 33: Ergebnisse der Western Blot-Analysen bezüglich Atrophie vom GC in der Vergleichsstudie. Ergebnisse sind als relative Werte angegeben. Angaben als Mittelwert ± SEM. *: p<0,05 vs. Placebo, **: p<0,01 vs. Placebo.

| Behandlung | Tiere [n] | MuRF1 | Tiere [n] | Mafbx |
|------------------------------|-----------|------------|-----------|-------------|
| Männchen und Weibchen | | | | |
| WT | 12 | 0,95±0,02 | 12 | 0,61±0,05 |
| Placebo | 10 | 1,00±0,08 | 8 | 1,00±0,22 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 10 | 0,73±0,12 | 10 | 1,07±0,17 |
| 20 mg/kg/d R-Oxprenolol | 9 | 0,96±0,05 | 9 | 1,14±0,14 |
| 10 mg/kg/d S-Oxprenolol | 9 | 0,83±0,08 | 8 | 0,94±0,14 |
| 20 mg/kg/d S-Oxprenolol | 9 | 0,85±0,09 | 11 | 0,84±0,13 |
| Männchen | | | | |
| WT | 6 | 0,79±0,03* | 6 | 1,13±0,07 |
| Placebo | 5 | 1,00±0,06 | 4 | 1,00±0,18 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 5 | 0,58±0,18 | 5 | 1,43±0,20 |
| 20 mg/kg/d R-Oxprenolol | 4 | 0,89±0,03 | 4 | 2,14±0,24* |
| 10 mg/kg/d S-Oxprenolol | 4 | 0,54±0,02* | 4 | 1,39±0,16 |
| 20 mg/kg/d S-Oxprenolol | 5 | 0,64±0,09* | 5 | 1,10±0,06 |
| Weibchen | | | | |
| WT | 6 | 1,17±0,03 | 6 | 0,46±0,05** |
| Placebo | 5 | 1,00±0,10 | 4 | 1,00±0,07 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 5 | 0,95±0,15 | 5 | 0,96±0,12 |
| 20 mg/kg/d R-Oxprenolol | 5 | 1,08±0,07 | 5 | 0,83±0,15 |
| 10 mg/kg/d S-Oxprenolol | 5 | 1,21±0,11 | 4 | 0,80±0,08 |
| 20 mg/kg/d S-Oxprenolol | 4 | 1,17±0,18 | 6 | 0,72±0,10 |

Tabelle 34: Auswertung der Ubiquitin-Proteasom-Aktivität [nmol/mg/min] im GC in der Vergleichsstudie. Angaben als Mittelwert ± SEM. *: p<0,05 vs. Placebo, **: p<0,01 vs. Placebo. PGPH= Petidyl-glutamyl-peptid Hydrolase

| Behandlung/Aktivität | Chymotrypsin [nmol/mg/min] | PGPH [nmol/mg/min] | Trypsin [nmol/mg/min] |
|------------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Männchen und Weibchen | [n] | [n] | [n] |
| WT | 763±70** | 13 | 561±34* |
| Placebo | 1438±164 | 8 | 955±142 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 1593±261 | 9 | 1143±146 |
| 20 mg/kg/d R-Oxprenolol | 1891±167 | 8 | 1177±103 |
| 10 mg/kg/d S-Oxprenolol | 1272±160 | 8 | 1008±152 |
| 20 mg/kg/d S-Oxprenolol | 1430±110 | 11 | 1086±94 |
| | | | 13 |
| | | | 8 |
| | | | 10 |
| | | | 8 |
| | | | 8 |
| | | | 11 |

| Männchen | | [n] | | [n] | [n] |
|---------------------------------|-----------|------------|-----------|------------|------------|
| WT | 697±119 | 7 | 581±56 | 7 | 793±102 |
| Placebo | 1040±132 | 4 | 590±48 | 4 | 909±53 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 998±117 | 5 | 795±103 | 5 | 686±60* |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 2187±183* | 4 | 1337±120* | 4 | 1603±138* |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 999±149 | 4 | 778±141 | 4 | 792±161 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 1246±135 | 6 | 967±93** | 6 | 956±107 |
| Weibchen | | [n] | | [n] | [n] |
| WT | 840±58** | 6 | 537±39** | 6 | 398±35** |
| Placebo | 1837±54 | 4 | 1320±55 | 4 | 1744±54 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 2337±232 | 4 | 1492±159 | 5 | 1318±122* |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 1594±196 | 4 | 1017±133 | 4 | 1159±131* |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 1544±219 | 4 | 1239±229 | 4 | 1212±212* |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 1650±129 | 5 | 1230±161 | 5 | 1059±132* |

Tabelle 35: Auswertung der Caspase-3- und -6-Aktivität [nmol/mg/min] im GC in der Vergleichsstudie. Angaben als Mittelwert ± SEM. *: p<0,05 vs. Placebo.

| Behandlung/Aktivität | Caspase 3 | Caspase 6 | |
|---------------------------------|----------------------|------------------|-------------|
| | [nmol/mg/min] | | |
| Männchen und Weibchen | | [n] | [n] |
| WT | 7,2±0,9* | 6 | 155,9±17,1* |
| Placebo | 13,1±2,5 | 7 | 243,9±33,4 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 12,1±1,5 | 8 | 269,8±13,7 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 15,2±1,9 | 8 | 317,7±33,0 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 17,1±1,9 | 8 | 341,1±19,6* |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 16,4±2,1 | 7 | 298,2±26,8 |
| Männchen | | [n] | [n] |
| WT | 1,9±1,9 | 2 | 181,3±13,9 |
| Placebo | 9,7±0,7 | 4 | 225,1±25,4 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 10,9±1,5 | 4 | 248,7±14,5 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 13,0±2,1 | 4 | 246,5±39,9 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 18,7±2,4* | 4 | 356,6±39,0 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 19,0±2,9* | 4 | 302,6±35,8 |
| Weibchen | | [n] | [n] |
| WT | 7,9±0,8 | 5 | 147,5±21,9 |
| Placebo | 17,7±5,0 | 3 | 268,9±77,4 |
| 30 mg/kg/d Rilutek | 13,3±2,7 | 4 | 291,0±19,1 |
| 20 mg/kg/d <i>R</i> -Oxprenolol | 17,4±3,0 | 4 | 388,9±9,9 |
| 10 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 15,4±3,0 | 4 | 325,6±10,7 |
| 20 mg/kg/d <i>S</i> -Oxprenolol | 12,8±1,3 | 3 | 293,9±45,4 |

DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Jochen Springer und Herrn Prof. Rupert Mutzel für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Insbesondere geht ein großer DANK an Herrn Dr. Jochen Springer, der mich während meiner Doktorarbeit hervorragend unterstützt und begleitet hat. Danke für die Geduld, Kritik und Erklärungsbereitschaft.

Vielen Dank an Herrn Prof. Stefan D. Anker, der es mir überhaupt erst ermöglicht hat, meine Doktorarbeit an der Charité Berlin zu beginnen und an der Universitätsmedizin Göttingen fortzuführen.

Außerdem gilt ein riesengroßes „DANKESCHÖN“ den Mitarbeitern des *Center for Cardiovascular Research* für die Unterstützung und Hilfe, egal wann ich sie brauchte. Ein besonderer DANK geht an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Schupp und von Prof. Dr. Ulrich Kintscher. Ich bedanke mich für die Kompetenz, Diskussionsbereitschaft und für die lustige Arbeitsatmosphäre. Dr. Anika Tschirner möchte ich für die Einarbeitung, die unendliche Arbeitsunterstützung und für das Korrekturlesen danken. DANKE auch an Henriette Knispel und Dr. Vincenzo Musolino sowie Sandra Palus, ohne die ich das Pensum an Arbeit sicher nicht bewältigen hätte können.

Durch die Doktorarbeit habe ich nicht nur an Erfahrung gewonnen, sondern auch neue Freunde gefunden. DANKE Kerstin Wöltje und Veronika Bobb, dass Ihr für mich immer ein offenes Ohr hattet. DANKE für die vielen schönen Stunden, die wir im Doktorandenraum verbracht haben. Ebenfalls möchte ich mich bei Euch für das Korrekturlesen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie und meine Freunde, die mich seelisch und moralisch unterstützt haben. DANK Euch habe ich immer wieder neue Kraft und Motivation geschöpft.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 08. September 2016

Cathleen Drescher