

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

Geschäftsführender Direktor:

Prof. Dr. R. Kinscherf

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Auswirkungen einer PACAP-Gendefizienz auf Purkinjezell-  
Degeneration und Atrophie des Kleinhirns im  
Superoxiddismutase-1 Mausmodell der Amyotrophen  
Lateralsklerose**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Jannik Burrichter

aus Lingen (Ems)

Marburg, 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 27.06.2022

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. Dr. B. Schütz

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. J.-W. Bartsch

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung: Die Amyotrophe Lateralsklerose, PACAP und Superoxiddismutase-1</b> .....	<b>1</b>
1.1 Prävalenzen und Pathologie der ALS.....	1
1.2 Diagnose, Symptome und Verlauf der ALS.....	3
1.3 Therapieansätze der ALS.....	5
1.4 Lage, Aufbau und Funktion des Kleinhirns, klinische Zeichen bei Störungen .....	7
1.5 Die Superoxiddismutase-1 (SOD1) .....	9
1.6 Der Neurotransmitter PACAP.....	13
1.7 Das SOD1-G93A Mausmodell der ALS.....	15
1.8 Auswirkungen einer Deletion von PACAP auf Neuroprotektion und Neuroinflammation im SOD1-G93A Mausmodell der ALS .....	16
1.9 Zielsetzungen der Arbeit .....	17
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1 Material .....	19
2.1.1 Geräte.....	19
2.1.2 Software .....	19
2.1.3 Gewebeproben.....	20
2.1.4 Schnittserien.....	21
2.1.5 Lösungen und Chemikalien .....	21
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Silanisieren und Vorbereitung der Objektträger .....	21
2.2.2 Herstellung von Gewebeschnitten .....	22
2.2.3 Giemsa-Färbung .....	23
2.2.4 Streckenanalyse der Purkinjzellschicht und Purkinjzellzählung .....	25
2.2.5 Die Funktionsweise der MRT und Parameter für diese Arbeit .....	26
2.2.6 Statistische Auswertung und Bestimmung der Signifikanz .....	28
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>

3.1	<i>Histologische Analyse der Purkinjzellschicht</i> .....	30
3.2	<i>MRT-Auswertung des Kleinhirn Querdurchmessers und der Länge</i> .....	38
3.3	<i>Vergleich von histologischen- und MRT-Flächenberechnungen</i> .....	41
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>45</b>
4.1	<i>Auswirkungen der SOD1-Mutation und des PACAP-Knockouts auf die Purkinjzellen des Kleinhirns</i> .....	46
4.2	<i>Auswirkungen von PACAP und SOD1-Mutation auf den makroskopischen Querdurchmesser und die Länge des Kleinhirns</i> .....	49
4.3	<i>Nutzbarkeit des Flächenvergleichs der histologischen- und MRT- Diagnostik im SOD1 (G93A)-Mausmodell</i> .....	51
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer</b> .....	<b>75</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>76</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
BAX	Apoptose förderndes Protein der Familie der Bcl2-Proteine
Caspase 3	Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Protease
$\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$	Kupfer-Zink
DNA	Desoxyribonukleinsäure
F	Fläche
FUS	RNA-bindendes Protein (Fused in Sarcoma)
G93A	Protein mit pathologischer Variante Glyzin zu Alanin an Position 93
hnRNP	heterogenes Ribonukleinprotein Partikel
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzellen
JPEG	Bilddateiformat
KI	Konfidenzintervall
KO	Knockout (hier: PACAP-Knockout Mutation)
L	Länge
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
Ncl.	Nucleus
PAC1 (Rezeptor)	PACAP-1-Rezeptor
PACAP	Pituitary-Adenylate-Cyclase-Activating-Protein
PZ	Purkinjezellen
QD	Querdurchmesser
MAP-Kinase	Mitogen activated Protein-Kinase
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	Sauerstoffradikale (wörtlich: reactive oxygen species)
SEP	Somatosensibel evozierte Potentiale
SOD1	Superoxiddismutase-1
TARBP; TDP-43	TAR-DNA-bindendes Protein 43
TE	Echozeit
TR	Repetitionszeit
TSE	Turbospinecho
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
VPAC 1	VIP/PACAP Rezeptor 1
VPAC 2	VIP/PACAP Rezeptor 2
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigste Genmutationen als Ursache für die familiäre und sporadische ALS.....	3
Abbildung 2: Übersicht der pathologischen Funktionsweisen und Auswirkungen der SOD1-Mutation in Motoneuronen.....	12
Abbildung 3: Pathologische Ursachen für Neuroinflammation und Motoneurondegeneration in Vesikeln und Stressgranula.....	12
Abbildung 4: Signalweg und Funktionsweisen von PACAP .....	14
Abbildung 5: Auswertung der Purkinjezellen im Querschnitt durch das Stratum purkinjense des Kleinhirns.. .....	26
Abbildung 6: Gewebeschnitte des Hirns von Maus E4318 nach Giemsa-Färbung .....	31
Abbildung 7: Darstellung des Kleinhirns von Maus E4318, Objektträger 24 (A), 31 (B) und 54 (C) nach Giemsa-Färbung .....	32
Abbildung 8: Bildreihe (A-L) der Purkinjezellschicht von Tier E4318, OT24, Schnitt A zur Quantifizierung der Purkinjezellen. Giemsa-Färbung.....	33
Abbildung 9: Repräsentative Bilder der in Tabelle 7 aufgeführten Mittelwerte vom Messzeitpunkt P60/70.....	35
Abbildung 10: Repräsentative Bilder der in Tabelle 7 aufgeführten Mittelwerte vom Messzeitpunkt Endstadium.....	36
Abbildung 11: Box-Plot-Diagramm der Zählungen der Purkinjezellen zum Zeitpunkt p60/70 sowie Endstadium (Tag 120).....	38
Abbildung 12: Magnetresonanztomographische Berechnung des Querdurchmessers (hellblau markiert) und der Länge des Kleinhirns (lila markiert) am Beispiel für das Tier K343. ....	39
Abbildung 13: Box-Plot-Diagramm der Größenunterschiede des Maus-Kleinhirns in den Parametern Querdurchmesser und Länge .....	41
Abbildung 14: Flächenberechnung im histologischen (A) und magnetresonanztomographischen Schnittverfahren (B).....	43

Abbildung 15: Ergebnisse der histologischen- und MRT-gestützten Flächenberechnung  
des Kleinhirn..... 44



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Geräte .....	19
Tabelle 2: Software.....	19
Tabelle 3: Lösungen und Chemikalien.....	21
Tabelle 4: Färbeprotokoll .....	23
Tabelle 5: Parameter der MRT-Sequenzen .....	28
Tabelle 6: Mausgruppen für die histologische Purkinjezellanalyse .....	34
Tabelle 7: Graphische Darstellung des Mittelwerts der Box-Plot-Analyse .....	35
Tabelle 8: Mausgruppen für die MRT-Berechnung des Querdurchmessers und der Länge zum Tag p60/70 und Endstadium (p120) .....	40
Tabelle 9: Einzelwerte der histologischen Analyse der Purkinjezellzahlen pro Tier im Vergleich unter den Gruppen sowie eine Mittelwertberechnung.....	69
Tabelle 10: MRT-Analyse der Parameter Querdurchmesser und Länge in coronarer Schnittführung .....	70
Tabelle 11: Histologische Flächenberechnung.....	72
Tabelle 12: MRT Flächenberechnung .....	73

# **1 Einleitung: Die Amyotrophe Lateralsklerose, PACAP und Superoxiddismutase-1**

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine neurodegenerative Erkrankung. Hauptsymptom ist ein Verlust der Willkürmotorik, bedingt durch ein kontinuierliches Absterben motorischer Nervenzellen in Cortex, Hirnstamm und Rückenmark (Brown & Al-Chalabi, 2017; Dukic et al., 2019). Die Erstbeschreibung dieser Motoneuronerkrankung wurde im 19. Jahrhundert von Jean-Martin Charcot durchgeführt (Charcot, 1869). Aktuell wird davon ausgegangen, dass sich die Pathologie der ALS nicht auf Motoneurone beschränkt, sondern dass es sich um eine multisystemische Netzwerkerkrankung mit charakteristischer gestörter Konnektivität handelt (Dukic et al., 2019).

## **1.1 Prävalenzen und Pathologie der ALS**

Die Erkrankung betrifft durchschnittlich 2-3 Personen pro 100.000 Menschen/Jahr und beginnt meist zwischen dem fünfzigsten und sechzigsten Lebensjahr ( $63.8 \pm 11.9$ ). Das Erkrankungsmaximum liegt in der Altersgruppe der 70-74-Jährigen. Das Geschlechterverhältnis der Erkrankten (Mann:Frau) beträgt in etwa 1,1:1 (Uenal et al., 2014). Der Tod tritt in der Regel 3-5 Jahre nach Diagnosestellung, meist durch respiratorisches Versagen, auf (Ludolph, 2015). Die ALS wird in eine sporadische Form (sALS), d. h. ohne genetische Komponente und in eine familiäre Form (fALS) eingeteilt. Es wird angenommen, dass ca. 90 % der ALS-Fälle sporadisch sind und 10 % vererbt werden (Brown & Al-Chalabi, 2017; Rosen et al., 1993). Die Entdeckung der  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  Superoxiddismutase 1 (SOD1) als erstes mit der ALS vereinbartes Gen (Rosen et al., 1993) und die Entwicklung eines darauf basierenden transgenen Mausmodells im Jahr 1994 (Gurney et al., 1994) konnten wesentlich zur Aufklärung möglicher zugrunde liegender Pathomechanismen beitragen. Die SOD1-ALS Mutation kommt in 20 % aller fALS und ca. 2-3 % der sALS Fälle zur Ausprägung. Insgesamt sind bereits mehr als 150 Mutationen in Protein-codierenden Genabschnitten entdeckt worden (Alsultan et al., 2016; Kaur et al., 2016; Saccon et al., 2013). Dargestellt sind die häufigsten Mutationen der fALS und sALS in Abbildung 1 (entnommen aus Hayashi, Homma & Ichijo, 2016). Die Mutationsausprägungen zeigen hauptsächlich ein autosomal-dominantes

Vererbungsmuster und sind in bereits über 30 weiteren, potentiell krankheitsmodifizierenden Genen nachgewiesen worden (Li & Wu, 2016). Eines dieser Gene ist das Chromosome 9 Open Reading Frame 72 (C9ORF72), welches bei bis zu 40% der fALS und ca. 6-9% der sALS durch eine Intron-Hexanucleotid-Mutation gekennzeichnet ist (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Goldstein et al., 2018; Renton et al., 2011). Das außerdem für die ALS bekannte TAR DNA-binding Protein (TARDBP) encodiert als TDP-43 (Neumann et al., 2006) ist in ca. 3-5 % der fALS und ca. 2 % der sALS nachweisbar (Neumann et al., 2006; Tarlarini et al., 2015). Sofern TARDBP bei zusätzlicher Krebserkrankung in Sarkomen eingeschmolzen vorliegt, wird es als FUS RNA-binding Protein bezeichnet und ist für ca. 5-6 % der fALS und ca. 1 % der sALS ursächlich (Ingre et al., 2015; Tarlarini et al., 2015). TDP-43 und FUS sind beides heterogene RNA-bindende, hauptsächlich im Nukleus vorkommende Riboproteine (hnRNP). Sie sind integriert in das Schneiden (Splicing) von mRNA sowie im Transport selbiger aus dem Nukleus in das Zytoplasma. Außerdem sind sie Bestandteil in der Gentranskription und Reifung von mikroRNA und sind am Formen von Stresskörperchen (stress granule) beteiligt. Eine Defizienz von TDP-43 durch nukleäre Depletion oder einer zytoplasmatischen Mislokalisierung sind für die ALS als möglich krankheitsfördernd beschrieben (Guerrero et al., 2016). In über 95 % der Fälle aggregieren die defizienten TDP-43 Proteine im Gehirn und dem Rückenmark und können in gekürzter hyperphosphorylierter und/oder ubiquitiniertes Form nachgewiesen werden (Chou et al., 2018). Weitere, weniger frequentierte ALS-Genmutationen bilden Kinesin Family Member 5A (Brenner & Weishaupt, 2019), CHCHD10 (Bannwarth et al., 2014), Matrin 3 (Johnson et al., 2014), Optineurin (OPTN) (Maruyama et al., 2010), Profilin 1 (Wu et al., 2012), Senataxin (Chen et al., 2004), Sequestosome 1 (SQSTM1/p62) (Fecto et al., 2011), TANK-binding Kinase 1 (TBK1) (Cirulli et al., 2015; Freischmidt et al., 2015), Ubiquilin 2 (UBQLN2) (Deng et al., 2011), Valosin-containing Protein (VCP) (Johnson et al., 2010) und VAMP-associated Protein B und C (VAPB) (Nishimura et al., 2004). Die molekularen Ursachen der ALS scheinen demnach vielfältig, sind bis heute jedoch nur in Teilen aufgeklärt.

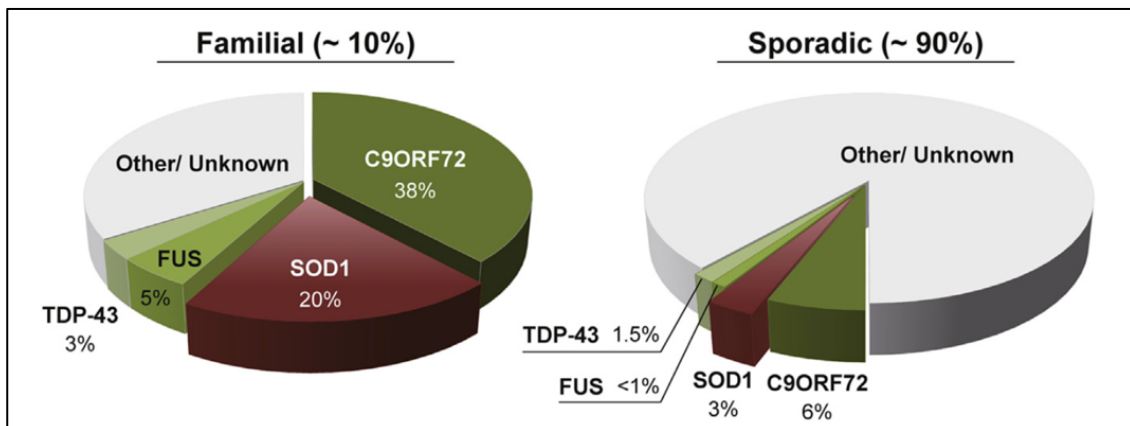


Abbildung 1: Häufigste Genmutationen als Ursache für die familiäre und sporadische ALS. (Hayashi et al., 2016)

## 1.2 Diagnose, Symptome und Verlauf der ALS

Die diagnostischen Kriterien für die Amyotrophe Lateralsklerose sind nach der revidierten Fassung der El-Escorial-Kriterien von 2015 (Hufschmidt et al., 2017):

1. Ausschluss alternativer Ursachen
2. Progrediente Nachweise von Defiziten im oberen und unteren Motoneuron an mindestens einer Körperregion
3. Eine klinische Untersuchung und/oder Elektromyographie (neuropathische Potenziale, Fibrillationen, und/oder positive scharfe Wellen) weist Defizite in zwei Körperregionen (bulbär, zervikal, thorakal, lumbal) nach
4. ALS ist mit demenziellen Syndromen und Verhaltensänderungen vereinbar
5. Sensibilitätsausfälle, Schmerzen und okulomotorische Symptome schließen keine ALS aus
6. Subformen können vorkommen:
  - a. progressive Bulbärparalyse: kombinierte Schädigung des ersten und zweiten Motoneurons, die sich ausschließlich auf die bulbären Muskeln beschränkt
  - b. Flail-Arm-Syndrom (Vulpian-Bernhart-Syndrom) oder Flail-Leg-Syndrom mit ausschließlicher oder überwiegender Schädigung des zweiten Motoneurons, initial asymmetrische periphere Paresen der Arme oder Beine

- c. progressive Muskelatrophie mit ausschließlicher Schädigung des zweiten Motoneurons und rasch progredientem Verlauf
- d. primäre Lateralsklerose mit dominanter Schädigung des ersten Motoneurons

Symptome und Verlauf der ALS (Hufschmidt et al., 2017; Ludolph, 2015):

Durch den Ausfall des ersten und zweiten Neurons kommt es zu verschiedenen neurologischen Symptomen: Die Motorikpathologien zeigen sich z. B. durch eine Atrophie sowie eine Schwäche distaler Muskeln. Eine Parese der kaudalen Hirnnerven (sogenannte progressive Bulbärparalyse) fällt vor allem durch eine emotionale Labilität mit pathologischem Lachen und Weinen auf. Weitere Anzeichen können eine Dysarthrie (erschwertes motorisches Sprechen) und Dysphagie (Schluckbeschwerden) sein. Muskeleigenreflexe können stärker werden, genauso können positive Pyramidenbahnzeichen sowie Spastiken und Fibrillationen auftreten. Ein Verlust dopaminerger Neurone im Mesencephalon kann durch fehlende Aufhebung der Inhibition zu einer rigiden Tonuserhöhung der Muskulatur führen. Dies kann als extrapyramidales Symptom klinisch mit einer Spastik (Störung des 1. Neurons) verwechselt werden. Die Atemmuskulatur und damit die Respiration wird im klinischen Verlauf zunehmend insuffizienter und ist auch der Grund für den letztlichen Tod durch die ALS. Die Sensibilität betreffend zeigen sich unspezifische Symptome wie Taubheit, Schmerzen, Brennen sowie vestibuläre Lagesinnprobleme und Ausfälle im Temperatur- und Vibrationsempfinden. Auffällige sensorisch evozierte Potentiale (SEP) zeigen sich bei der neurophysiologischen Untersuchung in bis zu 60 % der Fälle. Bei 15-60% der Patienten zeigen sich kognitive sowie Verhaltensauffälligkeiten in Frontalhirnfunktionen (Exekutive Dysfunktion) und Temporalhirnfunktionen (Gedächtnis). Bei 5-15 % gibt es eine Komorbidität von ALS mit der Frontotemporalen Demenz.

Eine Primärmanifestation beim Menschen ist zu 25 % bulbär und betrifft zu 40-50 % obere Extremitäten und zu 20-30 % die unteren Extremitäten. Die Primäre Lateralsklerose geht als Sonderform in 2 % der Fälle mit alleiniger Störung des ersten Motoneurons einher, bei der Progressiven Muskelatrophie ist zu 20 % nur das zweite Motoneuron betroffen. Bei all diesen Formen ist im Verlauf eine allmähliche Ausbreitung, mit kombinierten fokalen Schäden des oberen und unteren Motoneurons,

auf benachbarte oder funktionell zusammenhängende Motoneurone, auf kortikaler und spinaler Ebene, zu beobachten. Paresen breiten sich auf benachbarte Körperregionen oder auf die gegenüberliegende Seite aus.

### **1.3 Therapieansätze der ALS**

Die ALS ist zum aktuellen Stand der Forschung eine nicht heilbare neurodegenerative Krankheit. Aktuelle sowie früher untersuchte Therapieregime dienten lediglich dem Ziel der Lebenszeitverlängerung und der Symptomlinderung. Das speziell für die ALS zugelassene Medikament Riluzol (Handelsname: Rilutek oder Generika) führt zu einer milden Verbesserung der bulbären und Extremitätenfunktion, jedoch hat es keinen Effekt auf die Muskelstärke. Die resultierend höhere mittlere Überlebensdauer wurde mit 11.8 bis 14.8 Monaten beschrieben. Dies entspricht in etwa einer 9% höheren Ein-Jahr-Überlebens-Wahrscheinlichkeit (Miller et al., 2002; Miller et al., 2012). Riluzol verringert eine intrazelluläre Exprimierung von Glutamat und besitzt damit eine angenommene antioxidative Wirkung auf reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) (Seol et al., 2016). Die Effektivität von Riluzol ist jedoch bis heute nicht vollständig geklärt und im Zellversuch der SOD1 (G93A) konnte Riluzol keine Prävention vor dem Zelltod bewirken. Dies unterstützt die Theorie, dass eine alleinige Therapie mit Riluzol nicht so effektiv ist wie eine Kombinationstherapie (Sala et al., 2019). Die Kombination von Riluzol mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Masitinib (Handelsname Masivet) erscheint in einer aktuellen Studie als mild erfolversprechend (Mora et al., 2019)

In Amerika und Japan ist zum aktuellen Stand (im Jahre 2020) das antioxidativ-wirkende Edaravone (3-Methyl-1-phenyl-5-pyrazolon; Handelsnamen: Radicut; Radicava) zugelassen. In einer Studie von 2018 mit ALS Patienten konnten durch Edaravone gegenüber der Placebo-Gruppe körperliche Funktionsverluste um 33% verlangsamt werden (Bhandari & Kuhad, 2018). In einer Metaanalyse von Luo et al., 2019 konnten zudem keine weiteren nachteiligen Effekte bestätigt werden. Folgende, größer angelegte, randomisierte Kontroll-Studien sollen zukünftig die Wirksamkeit und Sicherheit von Edaravone bei der ALS untersuchen (Luo et al., 2019). Eine Zulassung von Edaravone für Europa durch die Europäische Arzneimittelbehörde (EMA) ist derzeit nicht gegeben. Die durchgeführten Edaravone-Studien wurden aufgrund der zu geringen Studienlaufzeit und dem fehlenden untersuchten Überlebenseffekt als nicht EMA-Leitlinien-entsprechend beurteilt (EMA- Nummer: EMA/293450/2019).

Weitere antiinflammatorische Behandlungsversuche fanden im Jahre 2002 durch Nimesulid sowie im Jahr 2020 durch Rofecoxib als Cyclooxygenase-2-Inhibitoren (COX-2) statt. Diese zeigten im Tiermodell eine Verzögerung der Motoneuronschädigung und wiesen damit auf eine wichtige Rolle der COX-2 als neuroimmunologische Komponente in der Entstehung sowie auf potentielle Therapiemöglichkeiten der ALS hin (Pompl et al., 2003; Zou et al., 2020).

Als ein weiterer Angriffspunkt für eine mögliche medikamentöse Therapie erscheint der Immunmodulator Histamin. Ihm wird eine neuroprotektive, anti-inflammatorische, remyelinisierende Rolle zugesprochen. Durch die Histaminrezeptoren 1 und 4 unterstützte Histamin in SOD1 (G93A)-Mäusen eine Antiinflammatorik mithilfe der Aktivierung von Mikroglia. Hierdurch wurden die Zahl des nukleären Faktors „kappa-light-chain-enhancer“ von aktivierten B-Zellen sowie die NADPH Oxidase 2 verringert. Gleichzeitig wurde Arginase 1 und der auf Thrombozyten vorhandene Adenosindiphosphat-Rezeptor P2Y<sub>12</sub> durch Histamin induziert. Alle diese Vorgänge waren jedoch nur in Mikroglia von ALS-Erkrankten und nicht in gesunden SOD1 (G93A)-Mäusen nachweisbar (Apolloni et al., 2019; Apolloni et al., 2017).

Eine Behandlung der ALS mit dem Antibiotikum Ceftriaxon zeigte in der Vergangenheit keine klinisch nachweisbare Effektivität (Cudkowicz et al., 2014; Robberecht, 1992; Smith, 1992). Eine Studie aus dem Jahr 2020 zeigt hingegen, dass Ceftriaxon eine Expression des Glutamat-Transporters GLT-1 in neurologisch erkrankten Mäusen fördert und resultierend Symptome sowie Pathologien, wie den Zelltod, verbessern kann (Smaga et al., 2020). Die mögliche Therapie der ALS mit dem Dopaminagonisten Ropinirol-Hydrochloride und die damit angenommene Verhinderung von Motoneuronverlusten wird derzeit erforscht. Die Ergebnisse sind jedoch erst in den nächsten Jahren zu erwarten (Morimoto et al., 2019; Takahashi et al., 2019).

Bei bestimmten Nebensymptomen der ALS können Behandlungsversuche unternommen werden. Für die Therapie einer gesteigerten Speichelproduktion (Hypersalivation) kann Botulinumtoxin (Incobotulinumtoxin A) zur Produktionsminderung eingesetzt werden, jedoch zeigte sich bei Patienten keine subjektiv wahrnehmbare Verbesserung im Schluckmechanismus (Paracka et al., 2019). Auch ein Training respiratorischer Muskeln bei Kindern mit neuromuskulären Erkrankungen wie der ALS, ergab keine Verbesserung der Lebensqualität oder körperlichen Funktionsfähigkeit. Zudem ist hier noch unsicher, ob es sogar eventuell nachteilige Effekte auf die ALS hat (Silva et al., 2019).

## **1.4 Lage, Aufbau und Funktion des Kleinhirns, klinische Zeichen bei Störungen**

Die Amyotrophe Lateralsklerose als multisystemische Netzwerkerkrankung (Dukic et al., 2019) führt im erkrankten Organismus zu vielfältigen, neurodegenerativen Veränderungen. Das Kleinhirn allein enthält 50 Milliarden Neuronen, was 50 % der gesamten Neuronen des Gehirns ausmacht (Trepel, 2015). Somit ist es mit seinen vielfältigen Funktionen und möglichen Ausfällen im Rahmen der ALS hinsichtlich des Aufbaus und der Funktionsweise für das zentrale Nervensystem genauer zu betrachten. Das Kleinhirn befindet sich dorsal der Pons, unter dem Tentorium cerebelli und gliedert sich in histologisch unterscheidbare Strukturen. Unterteilt werden kann das Parenchym in Kleinhirnrinde und das Mark. In der Rinde unterscheidet man weiterhin von innen nach außen das Stratum granulosum (Körnerschicht), das Stratum purkinjense (Purkinjzellschicht) und das Stratum molekulare (Molekularschicht). Funktionell besitzt die Purkinjzellschicht als einzige dieser Schichten eine efferente Projektion zu den Kleinhirnkernen und ist somit essentiell für die neurologische Funktionsfähigkeit des Kleinhirns (Trepel, 2015). Ohne Umschaltung der Kerne führen Purkinjzellen diese Projektionen unter anderem auch auf den Ncl. vestibularis lateralis durch (Ulfig, 2008).

Das Vestibulocerebellum (Archicerebellum, Ur-Kleinhirn) ist der älteste Teil des Kleinhirns und steht in Verbindung zu den Afferenzen aus den Vestibulariskernen. Hauptteilig wird dieser Kleinhirnabschnitt durch den Lobus flocculonodularis gebildet und ist für die Stütz- sowie Blickmotorik zuständig. Dies führt phylogenetisch (stammesgeschichtlich) zur Stabilisierung von Stand und Gang. Das Spinocerebellum (Paleocerebellum, Altkleinhirn) bekommt seine Afferenzen primär aus dem Rückenmark. Bestehend aus dem Kleinhirnwurm (Vermis) und der paravermalen Zone der Hemisphären sorgt es für eine Regulation des Muskeltonus im Körper (Ulfig, 2008). Das Pontocerebellum (Cerebrocerebellum, Neocerebellum) als größter und phylogenetisch zuletzt entwickelter Teil wird durch Afferenzen aus den pontinen Kernen versorgt. Es steht in enger Beziehung zum Telenzephalon. Gebildet aus den Partes laterales der Kleinhirnhemisphären ist die Funktion des Pontocerebellum vor allem Koordination von präziser Zielmotorik und der Sprechmuskulatur (Ulfig, 2008).



### Allgemein klinische Symptome bei Kleinhirnerkrankungen (Ulfig, 2008):

Dysmetrie	Fehlende Kontrolle darüber Bewegungen richtig abzumessen. Dies führt zu hypermetrischen Bewegungen.
Dysdiadochokinese	Zusammenwirken antagonistischer Muskeln ist pathologisch. Im klinischen Test zeigen sich Auffälligkeiten in den schnellen Pro- und Supinationsbewegungen, z. B. bei Schraubendrehen.
Intentionstremor	Auftreten von Zittern bei Bewegungsintention. Pathologisch ist im klinischen Test der Finger-Nase-Versuch.
Makrographie	Verwackelte, große Schrift
Skandierende Sprache	Abgehackte, stotternde Sprache
Rebound-Phänomen	Abruptes Abbremsen einer Bewegung ist unmöglich
Grobschlägiger Nystagmus	Langsame und schnell entgegen gerichtete Augenbewegung
Muskelhypotonie	Geschwächter Muskeltonus
Rumpf- und Stammalexie	Unruhiger Sitz und Stand, Schwanken
Gangatalexie	Unsicherer, breitbeiniger Gang, erhöhte Sturzneigung

### Spezielle Kleinhirnpathologien im Rahmen der ALS

Im Rahmen einer Multisystemerkrankung wie der ALS kann auch das Kleinhirn mit seinen Funktionswegen betroffen sein. Eine inflammatorische Antwort durch das Interleukin IL1B, den Tumornekrosefaktor TNF alpha sowie vermehrt aktivierte Microglia und eine Astrozytose konnten für das Kleinhirn der ALS-erkrankten Maus im Wobbler-Mausmodell nachgewiesen werden (Saber et al., 2016). Im Diffusionsgewichteten-MRT zeigt der Tractus Dentato-Rubro-Thalamo-Corticalis und der Tractus Spinocerebellaris nachweisbare Diffusionsstörungen in ALS-erkrankten Patienten im Gegensatz zu Gesunden (Tu et al., 2019). Im Rahmen der ALS führt eine Atrophie des Volumens der grauen Substanz des Gyrus praecentralis im Großhirn zu einer kompensatorischen Vergrößerung des Volumens der grauen Substanz im Kleinhirn

(entsprechend der Kleinhirnrinde) und zeigt somit die relevante Verbindung zwischen dem primären motorischen Cortex und dem Kleinhirn im Rahmen der Erkrankung (Qiu et al., 2019). Die Atrophie des Kleinhirnrindenvolumens korreliert im Rahmen der ALS jedoch nicht mit dem klinischen Ausmaß der kognitiven Beeinträchtigung bei Patienten (Consonni et al., 2019). Zudem sind cerebelläre Degenerationen volumetrisch eher fokal als global charakteristisch. Bei der sporadischen ALS imponieren cerebelläre Pathologien in Lappchen I-IV des Lobus anterior cerebelli, bei der C9ORF72 Mutation treten Degenerationen im Lobus posterior cerebelli auf (Bede et al., 2021).

Auch zellulärer Stress hat, z. B. durch eine Überexpression der humanen SOD1 im transgenen Mausmodell, neben dem bereits bekannten Einfluss auf Motoneurondegeneration, einen Effekt auf mikroskopischer Ebene des Kleinhirns. Hier kommt es zu einer Herunterregulation des Transportproteins Calbindin-1 in der Purkinjellschicht, was in einer höheren Vulnerabilität und nachfolgend in einer Degeneration der Purkinjellen resultieren könnte (Afshar et al., 2017). Auch für die ALS-assoziierten Gene Ataxin 2 und C9ORF72 konnte ein Purkinjellverlust im Verlauf der Erkrankung nachgewiesen werden (Chew et al., 2015; Tan et al., 2016). Konträr dazu hat zellulärer Stress am Anfang des Mauslebens aber auch einen permanenten proliferativen Einfluss auf die Neurogenese des Kleinhirns, besonders auf das Stratum granulosum (Roque et al., 2019). Aktuell kann aufgrund dieser z. T. gegensätzlichen Forschungsergebnisse keine klare Aussage darüber getroffen werden, wie definierend der Effekt von z. B. zellulärem Stress durch eine überexprimierte SOD1 im ALS-Mausmodell auf das Kleinhirn ist.

## **1.5 Die Superoxiddismutase-1 (SOD1)**

Wie bereits im Jahre 1993 publiziert, spielt die zytoplasmatische  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  Superoxiddismutase 1 (SOD1) des Menschen als Mutationsvariante eine große Rolle in der Entstehung der Amyotrophen Lateralsklerose (Rosen et al., 1993). Im Normalzustand reguliert die SOD1 die Redox-Potentiale durch Katalyse der Transformation von Superoxid-Anionen ( $\text{O}_2^-$ ) in Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Park et al., 2019). Die SOD1 ist damit ein Enzym, das eine antioxidative Wirkung auf zellulärer Ebene besitzt und eine Mutation dieser könnte daher zu erhöhtem zellulärem Stress führen (Shibata, 2001). Eine heterozygote Ausprägung der SOD1-Mutation, mit verminderter Enzymaktivität, ist bereits mehrfach als Ursache für die familiäre ALS beschrieben. Jedoch führt auch die

homozygote Form c.335dupG (p.C112Wfs\*11) zu einer vollständig fehlenden Funktionsfähigkeit der SOD1. Dieser Phänotyp ist mit schwerwiegenden progressiven Motoneuronverlusten, beinbetonten Tetraspastiken und leichter Atrophie sowie erhöhter Erschreckbarkeit bei Hyperekplexie (startle disease) assoziiert. Im Unterschied zur homozygoten Form zeigen heterozygote Träger keinen offenkundigen neurologischen Phänotyp (Park et al., 2019).

Im Rahmen der ALS ist oxidativer Stress auf eine vermehrte Bildung von zelltoxischen Sauerstoffradikalen (ROS) zurückzuführen, welche durch eine Fehlfunktion der SOD1 entstehen kann. Das aktive Zentrum der SOD1 benutzt als Enzym oberflächlich gelegenes Kupfer (Cu) als Katalysator. Eine erhöhte Reaktivität sowie eine erleichterte Erreichbarkeit für Substrate konnte bei einer erhöhten SOD1-Fehlfaltung oder bei Mutationen in der Enzymstruktur nachgewiesen werden (Bakavayev et al., 2019; Julien & Kriz, 2006). Dieser zelluläre Stress wurde bereits für die Auswirkungen der SOD1 (G93A)-Mutation untersucht und zeigt, dass eine aktive Sezernierung von Zytokinradikalen bei Microglia, welche durch die G93A-Mutation aktiviert werden, zum ALS-typischen Motoneurontod führt (Basso et al., 2013). Weitere nicht-zelluläre, autonome Gliazellen wie die Astrozyten und Oligodendrozyten zeigen bei einer selektiven Herunterregulierung der SOD1 in mutierten Tieren ein verlängertes Überleben, sodass im Umkehrschluss der SOD1-Mutation sowie den Gliazellen eine essentielle Rolle in der Pathogenese der ALS zugesprochen werden kann (Boillée et al., 2006; Wang et al., 2011; Yamanaka et al., 2008). Eine mitochondriale Dysfunktion durch die SOD1-Mutation geschieht über eine Verringerung der Atmungskettenaktivität und Herabsetzung der  $\text{Ca}^{2+}$  Pufferkapazität (Damiano et al., 2006; Mattiazzi et al., 2002). Glutamat als exzitatorischer Neurotransmitter im zentralen Nervensystem führt in der SOD1-mutierten Form über eine exzessive Freisetzung zu einer  $\text{Ca}^{2+}$  Überladung und somit zur oben beschriebenen mitochondrialen Dysfunktion (Tadic et al., 2014). Diese Glutamat-induzierte Neurotoxizität wird als Exzitotoxizität bezeichnet und als pathologische Grundlage für die ALS vermutet (Rothstein et al., 1992). Unterstützt wird dies durch die nachgewiesene Wirksamkeit des Wirkstoffs Riluzol, welcher den Verlauf der ALS durch Reduzierung Glutamat-induzierter Toxizität modifizieren kann (Bensimon et al., 1994). Das endoplasmatische Retikulum, beeinflusst durch die SOD1-Mutation, zeigt eine Störung in der Proteinqualitätskontrolle, eine Überladung durch neu synthetisierte Polypeptide und führt resultierend über zellulären Stress zur Zellapoptose.

Diese Vorgänge sind für die sALS sowie die fALS beschrieben (Atkin et al., 2008; Nagata et al., 2007). Ein gestörter axonaler Vesikeltransport konnte in SOD1-mutierten Mäusen nachgewiesen werden (Pun et al., 2006) und könnte im Zusammenhang mit einer Krankheitsverschlimmerung der ALS durch aufgehaltene Transport essentieller zellulärer Bestandteile stehen. Eine Prionen-ähnliche Vermehrung und ein Zusammenbau der mutierten SOD1 durch z. B. Zell-zu-Zell-Übertragung steht im Zusammenhang mit neuroinflammatorischen Prozessen mit resultierendem Motoneurontod (Brown & Al-Chalabi, 2017; Grad et al., 2014).

Zusätzlich zu den unter Kapitel 1.1 beschriebenen Prävalenzen und Pathologien sind die hier genannten pathologischen Funktionsweisen und Auswirkungen der SOD1-Mutationen in Abbildung 2 dargestellt. Neben der mutierten SOD1 spielen jedoch auch weitere Pathologien eine Rolle in der neuroinflammatorischen und letztlich neurotoxischen Motoneuronendegeneration im Rahmen der ALS. Die wichtigsten in der Literatur beschriebenen Vertreter sind in Abbildung 3 dargestellt. Zu nennen sind u. a. TANK-binding Kinase 1 (TBK1) (Cirulli et al., 2015; Freischmidt et al., 2015), Optineurin (OPTN) (Maruyama et al., 2010) und Sequestosome 1 (SQSTM1/p62) (Fecto et al., 2011).

Da die ALS erst dann diagnostiziert werden kann, wenn das Absterben von Motoneuronen bereits in vollem Gange ist, muss es das Ziel experimenteller Bemühungen sein, einerseits noch lebende Motoneurone vor dem Zelltod zu bewahren und in ihrer Funktion zu erhalten. Andererseits fehlen bislang auch suffiziente spezifische Biomarker, die gefährdete Motoneurone bereits in einem frühen Erkrankungsstadium identifizieren können. Neuropeptide wie z. B. PACAP sind hier interessante Kandidaten, die solch eine neuroprotektive bzw. diagnostische Stellung übernehmen könnten. Diese mögliche tragende Rolle in der ALS Erkrankung ist bisher kaum untersucht und sollte Fokus dieser Arbeit sein.

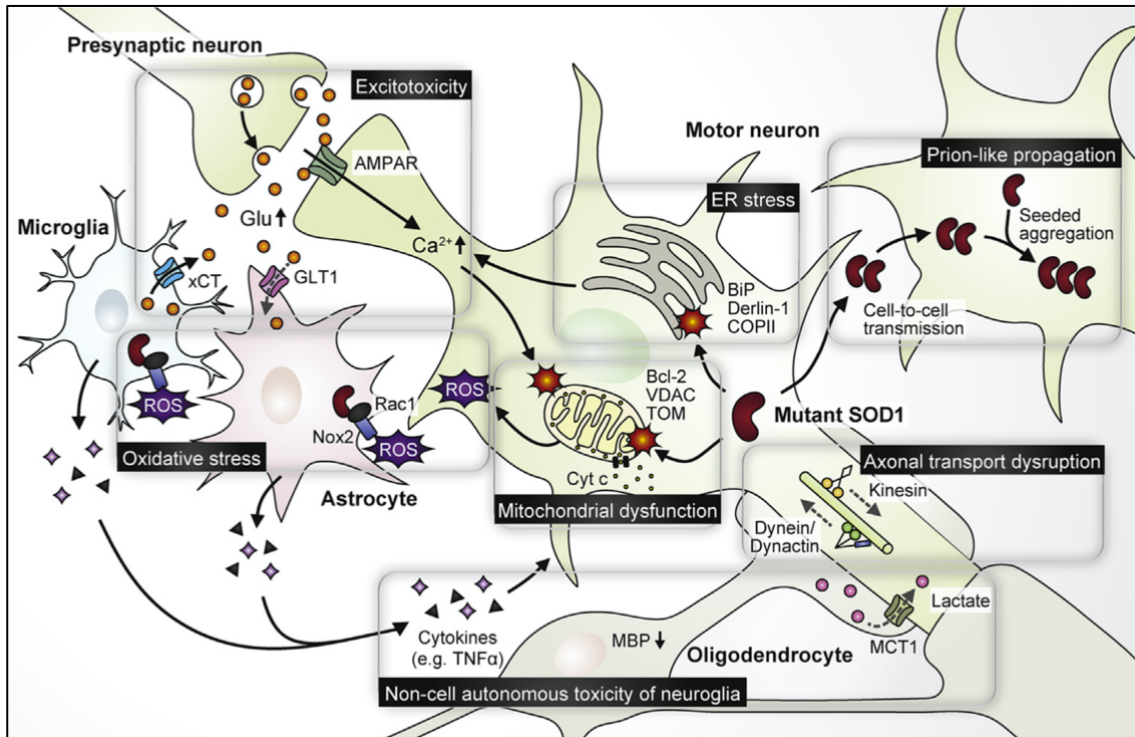


Abbildung 2: Übersicht über die pathologischen Funktionsweisen und Auswirkungen der SOD1-Mutationen in Motoneuronen und Gliazellen. Signalwege, die durch die SOD1-Mutation verstärkt werden sind mit einem schwarzen Pfeil markiert und verminderte Prozesse sind mit einem gepunkteten Pfeil markiert. Eine mutierte SOD1 führt u.a. zu einer Mitochondriendysfunktion, zu zellulärem Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER), zu einer Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und zu einer Glutamat-induzierten Exzitotoxizität. Ein gestörter axonaler Transport, ein verminderter Stoffwechsel der Myelinscheiden und nichtzelluläre autonome Prozesse wie Neuroinflammation oder Prionen-artige Vermehrung können ebenfalls Motoneurone schädigen. (Hayashi et al., 2016)

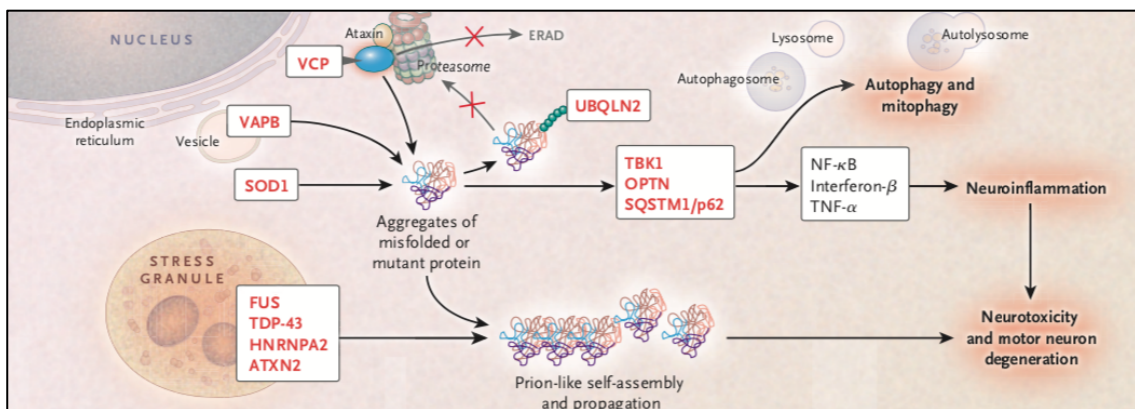


Abbildung 3: Pathologische Ursachen für Neuroinflammation und Motoneurondegeneration in Vesikeln und Stressgranula. Proteine wie z. B. SOD1 können über eine Fehlfaltung zu einer Hochregulierung von Signalsubstanzen wie NF-κB, Interferon-β oder TNF-α führen. In Stressgranula führt z. B. TDP-43 zu einer Prionen-ähnlichen Vermehrung und zum Zusammenbau der fehlgefalteten Proteine. Beide Mechanismen in den Vesikeln sowie in den Stressgranula führen zu Neurotoxizität und Motoneurondegeneration (Brown & Al-Chalabi, 2017).

## 1.6 Der Neurotransmitter PACAP

Das Neuropeptid Pituitary-adenylate-cyclase-activating-polypeptide (deutsch: Hypophysen-Adenylatcyclase-aktivierendes-Protein; PACAP) wurde initial aus dem Hypothalamus isoliert und gehört zu einer Genfamilie, der auch das Vasoaktive Intestinale Polypeptid (VIP), Secretin, das Wachstumshormon (GH) sowie Glucagon angehören (A. Miyata et al., 1989; Vaudry et al., 2009). Funktionell sind mit PACAP38 (38 Aminosäuren) und PACAP27 (27 Aminosäuren) zwei Isoformen beschrieben. Beide Varianten unterscheiden sich zwar durch die unterschiedliche Aminosäurekettenlänge, jedoch ähneln sie sich in der Aktivierung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in der Hypophyse (Atsuro Miyata et al., 1989; A. Miyata et al., 1989; Miyata et al., 1990; Sherwood et al., 2000). Im ZNS wird PACAP u.a. von Neuronen im Hippocampus, der Amygdala, der Substantia nigra, und der cerebellären Purkinjezellschicht exprimiert. Im PNS sind sensible Neurone im Spinalganglion PACAP-positiv (Botia et al., 2007; Hannibal, 2002). Auch in sympathischen und parasympathischen Neuronen sowie in einigen somatomotorischen Neuronen konnte PACAP nachgewiesen werden (Fahrenkrug & Hannibal, 2004; Hannibal, 2002). Darüber hinaus wird PACAP aber auch von manchen Gliazellen, Endothelzellen, Lymphozyten und Makrophagen exprimiert (Dickson & Finlayson, 2009). PACAP entfaltet seine Wirkung über die drei G-Protein-gekoppelten transmembranen Rezeptoren PAC1, VPAC1 und VPAC2 (Harmar et al., 2012). Während PAC1 selektiv nur PACAP bindet, wirken PACAP und das verwandte VIP mit ähnlicher Affinität auf VPAC1 und VPAC2. Die PACAP-Rezeptoren aktivieren, vermutlich über eine direkte oder indirekte Epithelial-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR)-Aktivierung (Maugeri et al., 2019; Moody et al., 2019), Signalkaskaden wie unter anderem Proteinkinase A, Proteinkinase C (Vaudry et al., 2009), MAP-Kinasen (Lelièvre et al., 1998) und NF- $\kappa$ B (Delgado & Ganea, 1999). Abgebildet ist diese Funktionsweise nachfolgend in Abbildung 4.

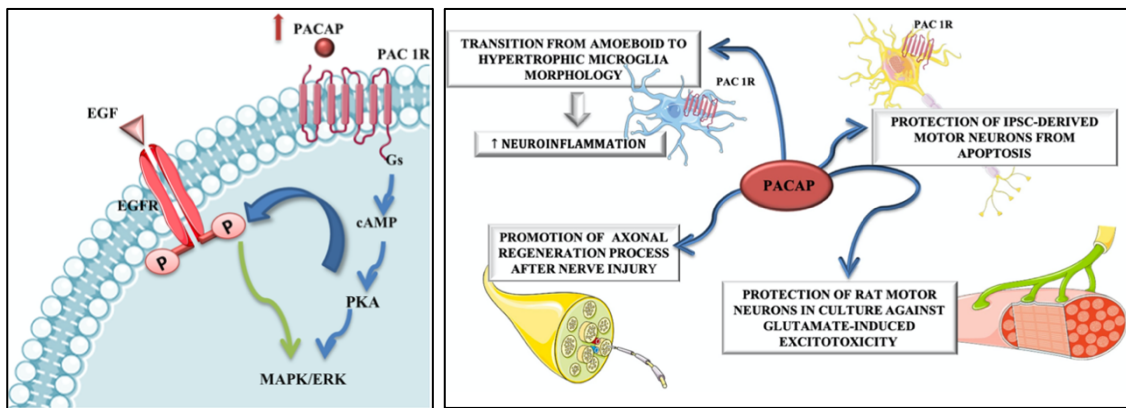


Abbildung 4: Signalweg und Funktionsweisen von PACAP. PACAP wird über den G-Protein gekoppelten PAC1 Rezeptor gebunden und nimmt über cAMP und Proteinkinase A Einfluss auf die MAP-Kinasen. Dieser Signalweg wird auch durch den Epithelial Growth Factor (EGF) unterstützt. PACAP besitzt zudem Einflüsse auf die Umwandlung von Mikroglia von einer amöboiden zur hypertrophen Morphologie und führt somit zu einer vermehrten Neuroinflammation. Eine Verstärkung von axonaler Regeneration nach Nervenverletzung ist zudem nachgewiesen. Protektive Wirkungen von PACAP auf die Apoptose von IPSC-abgeleiteten Stammzellen aus Motoneuronen sowie auf Glutamat-induzierte Exzitotoxizität von Ratten-Motoneuronen konnte nachgewiesen werden (Maugeri et al., 2020).

PACAP besitzt, wie unter Abbildung 4 aufgeführt, verschiedene neuroprotektive, aber auch neuroinflammatorische Funktionen und Auswirkungen auf das ZNS. Eine Wirkung im traumatischen Kontext konnte bei der axonalen Regeneration von axotomierten Nervi faciales im Umkehrschluss gezeigt werden. Einerseits führte eine PACAP-Defizienz zu einer Verzögerung der Nervenregeneration (Armstrong et al., 2003), andererseits zu einer Herunterregulation von PAC1 nach Verletzung und wies somit auf eine erhöhte Zellapoptose hin (Mattsson et al., 2006). Des Weiteren wird dem PAC1 durch eine Signalverstärkung ein milderndes Potenzial auf Neurodegeneration, cerebrovaskuläres Trauma (z. B. Schlaganfall) oder peripheres Organversagen zugesprochen (Liao et al., 2019). Auch für akute Infektionen wie der Toxoplasmose durch den Parasiten *Toxoplasma gondii* besitzt PACAP eine zellprotektive Wirkung auf periphere Immunzellen. PACAP konnte im Versuch die Immunantwort auf den Erreger durch Erhöhung der Phagozytosekapazität der Makrophagen und Monozyten verbessern und die Produktion von inflammatorischen Zytokinen verringern (Figueiredo et al., 2019).

Für eine Involvierung von PACAP im Rahmen chronischer, neurodegenerativer Erkrankungen wie der ALS spricht zunächst das im okulomotorischen Kern im Gegensatz zum hypoglossalen Kern hochregulierte Gen ADCYAP1, welches für PACAP kodiert. Dies deutet auf eine geringere Vulnerabilität der Muskeln für Augenbewegung durch eine

trophische Wirkung von PACAP in ALS-erkrankten Motoneuronen hin (Maugeri et al., 2020). Weiterhin ist eine potentielle neuroinflammatorische und/oder neuroprotektive Wirkung von PACAP aktueller Stand der Wissenschaft. So könnte PACAP einerseits durch Überführung von Mikrogliazellen von amöboider zu hypertropher Struktur (Ringer et al., 2013) die Neuroinflammation im SOD1-G93A Mausmodell der ALS forcieren, jedoch führt gegensätzlich auch eine PACAP-Defizienz bei Knockout Mäusen (PACAP<sup>-/-</sup>) zu einer Apoptose-steigernden Expression von Caspase-3 und somit zu einer abweichenden Entwicklung im unreifen Kleinhirn (Allais et al., 2007). Eine Verbindung von PACAP mit zelltodreduzierender Wirkung auf Motoneurone ist in diversen Studien untersucht worden. So reduziert PACAP eine Hypoxie-induzierte Akkumulation von mutierter SOD1 und führt somit auch zu verringerter unkontrollierter Autophagie und Zelltod (D'Amico et al., 2020). Durch eine Behandlung von humanen ALS-erkrankten Motoneuronen mit PACAP zeigte sich eine verbesserte Erhaltung der Zell-Vitalität und eine Verringerung des Apoptose-Marker-Proteins BAX (Bonaventura et al., 2018). Appliziertes PACAP wirkt zudem protektiv auf hyaline Matrizen gegenüber oxidativem Zellstress durch Inhibition von Matrix-zerstörenden Enzymen (Szentléleky et al., 2019). Auch eine schützende Wirkung vor glutamaterg-induzierter Toxizität konnte für PACAP nachgewiesen werden (Morio et al., 1996). Diese anti-glutamaterge Wirkung nutzt man bereits therapeutisch im Rahmen der ALS durch das Medikament Riluzol (Bensimon et al., 1994) und wirft die Frage auf, inwieweit PACAP diese Neuroprotektion in der Zukunft unterstützen könnte.

## **1.7 Das SOD1-G93A Mausmodell der ALS**

Die Entdeckung der Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> Superoxiddismutase 1 (SOD1) als erstes mit der ALS-vereinbares Gen und das erste transgene SOD1-Mausmodell aus dem Jahr 1994 konnten wesentlich zur Aufklärung möglicher zugrunde liegender Pathomechanismen beitragen (Gurney et al., 1994; Rosen et al., 1993). Bis zum heutigen Tag wurden über 20 verschiedene SOD1-Mutation-Mausmodelle etabliert (De Giorgio et al., 2019). Die verwendeten Mäuse in dieser Arbeit tragen entsprechend dem SOD1-G93A Mausmodell eine hohe Anzahl menschlicher SOD1 mit der pathologischen Punktmutation Glyzin zu Alanin an Protein-Position 93 (G93A). Resultierend führen sowohl heterozygote, als auch homozygote SOD1-Mutationsausprägungen zu verstärktem neuromuskulärem Zerfall



(Gurney et al., 1994; Park et al., 2019). Die Symptome der ALS-erkrankten Mäuse sind vergleichbar mit denen des Menschen.

So fallen im präsymptomatischen Stadium (< Tag 90) der Erkrankung SOD1-transgene Mäuse zunächst bei elektrophysiologischen Untersuchungen auf. Hier zeigen sich eine erhöhte Amplitude sowie ein erhöhter durchschnittlicher Neurotransmittervesikelinhalt (Quantal Content) im Endplattenpotential. Dies suggeriert eine erhöhte Freisetzung von Acetylcholin in den synaptischen Spalt. Eine gleichzeitige höhere Frequenz von Giant-Miniature-Endplattenpotentialen (GMEPPs) spricht derweil für eine Degeneration der intrazellulären  $Ca^{2+}$  Konzentration in Nervenenden. Für die Miniatur-Endplattenpotentiale (MEPP) mit ~0.4 mV deutet die erhöhte Amplitude bei gleichzeitig erniedrigter durchschnittlicher Anstiegszeit auch auf post-synaptische Veränderungen hin (Rocha et al., 2013).

Im bereits symptomatischen Stadium der ALS (> Tag 90 – ca. Tag 120) ist klinisch vor allem ein deutlicher Gewichtsverlust der Mäuse nachzuweisen (Ringer et al., 2013). Des Weiteren sind für die ALS-Mausmodelle Muskelatrophien, unsicherer Gang und Tremor nachweisbar (Stephenson & Amor, 2017). Letztendlich führt die Erkrankung zu zunehmender Paralyse durch Verlust von Motoneuronen im Rückenmark (Gurney et al., 1994). Im Prinzip sind die überwiegende Anzahl an bislang erforschten und postulierten Pathomechanismen auf Untersuchungen am SOD1-G93A Mausmodell der ALS zurückzuführen, was den Stellenwert dieses Modells untermauert (siehe Abb. 2).

Wie bereits beschrieben sind Pathologien auf elektrophysiologischer Ebene zum Teil auch bei der ALS im symptomatischen Stadium des Menschen nachweisbar. So ist ein auffälliges Sensorisch-evoziertes-Potential (SEP) bei der neurophysiologischen Untersuchung in bis zu 60 % der Fälle nachweisbar und kann für die Diagnose der ALS nach den El-Escorial Kriterien hinzugezogen werden (Hufschmidt et al., 2017).

## **1.8 Auswirkungen einer Deletion von PACAP auf Neuroprotektion und Neuroinflammation im SOD1-G93A Mausmodell der ALS**

In der dieser Dissertation zugrunde liegenden Arbeit von Ringer et al., 2013 wurden mögliche autokrine und parakrine Effekte von PACAP-Signalen auf Neuroinflammation und Neuroprotektion im SOD1-G93A Mausmodell der ALS untersucht. Der PACAP-spezifische Rezeptor PAC1 konnte bei den Wildtyp-Mäusen in somatomotorischen und

viszeromotorischen Neuronen des Hirnstamms nachgewiesen werden, jedoch exprimierten nur die viszeromotorischen Neurone PACAP als autokrine Grundlage für die Rezeptorregulation. Die SOD1 (G93A)-Mäuse zeigten im Gegensatz dazu nur eine geringe Induktion der PACAP mRNA in den ALS-geschädigten somatomotorischen Neuronen und die Degeneration war unverändert. Sympathische, präganglionäre viszeromotorische Neurone waren in den SOD1 (G93A)-Mäusen im Verlauf der ALS resistent, während die präganglionären parasympathischen Neurone zunehmend degenerierten. PACAP-defiziente SOD1-Mäuse zeigten, neben einem noch stärkeren parasympathischen Neuronenverlust als die Gruppe der alleinigen SOD1-Mutation, zusätzlich eine Degeneration der präganglionären sympathischen Neurone. Resultierend konnte eine Expression von PACAP und PAC1 mit einer möglichen Neuroprotektion von zentralen viszeromotorischen Motoneuronen in SOD1-Mäusen mithilfe autokriner Mechanismen in Verbindung gebracht werden. Der neuroinflammatorische Fortschritt durch nachgewiesenen Wechsel der Mikroglia von einer amöboiden zu einem hypertrophen Phänotyp, konnte in den SOD1-Mäusen, jedoch nicht in den PACAP-defizienten SOD1-Mäusen, nachgewiesen werden. Somit könnte endogen zugeführtes PACAP zytotoxische Mikrogliafunktionen fördern und damit die ALS-Erkrankung vorantreiben. Diese Hypothese stimmte mit der Verlängerung der Lebenserwartung, der Erhaltung der untersuchten motorischen Funktion der Zunge und damit des parasympathischen N. hypoglossus (XII) bei PACAP-defizienten-SOD1-Mäusen gegenüber PACAP-Wildtyp-SOD1-Mäusen überein. Zusammenfassend konnte die mögliche protektive Rolle der PACAP Expression in viszeromotorischen Neuronen und der gegensätzliche Effekt in der Funktionsweise der Mikroglia bei den SOD1-Mäusen nicht abschließend geklärt werden. Diese zurückliegenden Ergebnisse von Ringer et. al., 2013 sollten daher für diese Dissertation als Grundlage dienen.

## **1.9 Zielsetzungen der Arbeit**

Basierend auf den Ergebnissen von Ringer et al. scheint PACAP mögliche neuroprotektive sowie möglicherweise degenerative Effekte auf Nervenzellen im SOD1-Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose zu haben. Die aufgeführten Ergebnisse bezogen sich jedoch nur auf Areale des Hirnstamms und Teile des Rückenmarks. Eine Aussage über das Kleinhirn im Laufe der ALS Erkrankung wurde nicht getroffen. Speziell PACAP wird im Kleinhirn von den Purkinjezellen exprimiert, der zugehörige

PAC1-Rezeptor findet sich in den Granulosazellen des Stratum granulosum (Botia et al., 2007). Gebunden werden PACAP und das verwandte VIP über VPAC1 und VPAC2, welche vor allem durch Neurone, Gliazellen, Endothelzellen, Lymphozyten und Makrophagen exprimiert werden (Dickson & Finlayson, 2009). Das Kleinhirn als wichtiges Verschaltungszentrum für feinmotorische, muskuläre Bewegungen spielt im Rahmen der neurodegenerativen ALS damit eine entscheidende Rolle. Es besitzt als alleinstehende Struktur des Gehirns bereits 50 Milliarden Neuronen, was 50 % der gesamten Neuronen des Gesamthirns ausmacht (Trepel, 2015). Durch diese Reichhaltigkeit an Neuronen ist zu vermuten, dass zu Beginn der Erkrankung ein erhöhter Zellzerfall nachgewiesen werden könnte. Mit dieser Arbeit sollte zentral untersucht werden, welche Wirkung der Neurotransmitter PACAP im SOD1-Mausmodell der ALS auf das Kleinhirn makro-sowie mikroskopisch hat.

Dazu wurden zunächst Maushirngewebe von Ringer et al. (2013) herangezogen, histologische Präparate von den Mäusehirnen inklusive Kleinhirn erstellt und nach dem Färben mit Giemsa-Färbung unter dem Mikroskop analysiert. Hierbei wurden die Purkinjezellen des Kleinhirns im Rahmen der ALS-Erkrankung auf mögliche Zelldegeneration histologisch untersucht.

In einem zweiten Schritt betrachtete diese Arbeit die möglichen makroskopischen Unterschiede in der Kleinhirngröße unter Einfluss von PACAP. Dazu wurden Magnetresonanztomographie (MRT)-Bilder von SOD1- und/oder PACAP-defizienten Mäusen angefertigt.

In einem letzten Schritt wurden histologische Bilder mit MRT-Bildern auf ihre Nutzbarkeit für einen Nachweis makroskopischer Veränderung im Verlauf der ALS geprüft und verglichen. Hier sollte untersucht werden, ob bereits in vivo eine Aussage über eine mögliche Kleinhirnatrophie durch das MRT gemacht werden kann. Derzeitig ist dies nur über eine postmortale Sektion möglich.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Zur Anfertigung der histologischen Kleinhirn-Präparate wurden folgende Geräte verwendet:

*Tabelle 1: Geräte*

<b>Name</b>	<b>Modell</b>	<b>Firma</b>
Magnetrührer	MR-80	Heidolph Instruments GmbH (Schwabach)
Inkubator	Function Line UT6	Heraeus Electronics Corporation (Hanau)
Mikroskop	Provis AX 70	Olympus (Hamburg)
Mikroskop-Objektiv	SWH10x-H/26.5	Olympus (Hamburg)
Digitalkamera	UC90	Olympus (Hamburg)
Rotationsmikrotom	HM 325	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts)
Reinstwasseranlage	xCAD	TKA-Wasseraufbereitung (Niederelbert)
Thermoplatte	Präzitherm	Störk-Tronic (Stuttgart)
Vortex	MS2 Minishaker	IKA (Staufen)
Wasseraufbereitung	Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand (Wertheim)

#### 2.1.2 Software

*Tabelle 2: Software*

<b>Name</b>	<b>Firma</b>
cellSens	Olympus Life Science
GraphPad Prism 4.0	GraphPad Software (San Diego, USA)

Name	Firma
ImageJ 1.X	National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA)
Horos DICOM Viewer	Free and open source code software (FOSS) program that is distributed free of charge under the LGPL license at Horosproject.org and sponsored by Nimble Co LLC d/b/a Purview in Annapolis, MD USA
Windows 7 Professional	Microsoft (Redmond, USA)
Word, Excel, PowerPoint (Office 365)	Microsoft (Redmond, USA)

### 2.1.3 Gewebeproben

Die zu untersuchenden Gehirne für die histologische Analyse wurden in den Untersuchungen von Dr. Cornelia Ringer im Rahmen eines Tierversuches (Genehmigungsnummer 65/2007, RP Gießen) aus Mäusen entnommen, fixiert und in Paraffinblöcken konserviert (Ringer et al., 2013). Genotyp, Messzeitpunkt und Identifikationsnummer der Mäuse sind in Tabelle 9 im Anhang dargestellt. Das präsymptomatische Stadium wurde mit Tag p60/70 und das Endstadium mit Tag p120 definiert.

Für den radiologischen Abschnitt dieser Arbeit wurden erneut 24 Maushirngewebe verwendet und im MRT untersucht. Die für die Arbeit verwendeten Datensätze der Mausgehirne lagen zum Teil bereits vor (Genehmigungsnummer G5/2018, RP Gießen; Dissertation von Dr. med. dent. Carolin Kresse aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie, Marburg, 2019). Die reinen PACAP-Knockout Tiere entstammen aus eigener Zucht des Instituts für Anatomie und Zellbiologie, Marburg (Genehmigungsnummer Ex-06-2018, PU Marburg). Alle verwendeten Mäuse hatten den genetischen Hintergrund C57BL/6. Alle untersuchten Tiere sind unter Angabe des Messzeitpunkts, Genotyp und Identifikationsnummer in Tabelle 10 dargestellt.

## 2.1.4 Schnittserien

Bereits im Jahr 2013 wurden von einem Großteil der vorhandenen Paraffinblöcke Schnittserien angefertigt. Diese sind auch für diese Arbeit herangezogen, durch weitere Objektträger erweitert und mit Giemsa-Lösung gefärbt worden.

## 2.1.5 Lösungen und Chemikalien

*Tabelle 3: Lösungen und Chemikalien*

<b>Lösungen</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Giemsa-Lösung		Carl Roth (Karlsruhe)
	TESAP (Triethoxilyl-propylamin)	Merck KGaA
	Aceton	Carl Roth (Karlsruhe)
	Xylol (Dimethylbenzen)	Carl Roth (Karlsruhe)
	Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
	Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	Carl Roth (Karlsruhe)
	Eukitt Eindeckmedium	Sigma Aldrich

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Silanisieren und Vorbereitung der Objektträger

#### Vorbereitung der Objektträger durch Silanisierung

Die Objektträger wurden zur besseren Anhaftung der Gewebeschnitte mit TESAP beschichtet. Diesen Vorgang nennt man „silanisieren“. Hierzu wurde vorab eine Waschlösung mit etwa 60 °C heißem Wasser mit einer haushaltsüblichen Menge an Spülmittel versetzt. Des Weiteren wurden 70%iger Ethanol in Reinstwasser, technisches Aceton sowie 2% TESAP (Triethoxilyl-Propylamin) und demineralisiertes Wasser bereitgestellt.

### Waschung der Objektträger

Zuerst wurden die Objektträger in Halter eingesetzt sowie verkratzte Objektträger vorab aussortiert. Die Halter wurden danach in durchsichtige Kästen zu je 200 Objektträgern eingeräumt und danach für eine Stunde mit Waschlösung auf einem Schüttler gewaschen. Für 200 Objektträger wurden etwa 1,7 L heißes Wasser mit einem Schuss Spülmittel benötigt. Anschließend wurde der Inhalt der Kästen dreimal mit heißem Wasser gewaschen. Es erfolgte ein Waschdurchgang mit demineralisiertem Wasser sowie einmal mit Reinstwasser aus der Reinstwasseranlage. Zuletzt wurden die Objektträger mit 70%igem Ethanol für 45 min gewaschen. Nach dem Waschen der Objektträger erfolgte nun zuerst eine Trocknung im Trockenschrank bei 60 °C. Nach einer Kontrolle, ob die Objektträger einwandfrei getrocknet waren, wurden jeweils eine Spülwanne mit demineralisiertem Wasser und eine mit destilliertem Wasser vorbereitet. Drei weitere Schalen wurden mit je 200 ml Aceton befüllt und nur die erste mit 4 ml TESAP (somit 2%ige Konzentration) versetzt.

### Beschichtung

Die Objektträger wurden für 30 Sekunden in die Schale mit 2%igem TESAP eingetaucht, anschließend jeweils einmal 30 Sekunden in die Schalen mit Aceton. Daraufhin folgte ein kurzes Eintauchen in das demineralisierte, danach in das destillierte Wasser. Hierauf folgend wurden die Objektträger bei 42 °C getrocknet.

## **2.2.2 Herstellung von Gewebeschnitten**

Die in dieser Arbeit untersuchten Mäusehirne stammten alle aus der Arbeit von Ringer et al. (2013) und wurden von Dr. Cornelia Ringer und Prof. Dr. Burkhard Schütz für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Des Weiteren lagen vom Großteil der bereits in Paraffinblöcken konservierten Gewebe Schnittserien vor. Da diese Serien zum Teil unvollständig vorhanden waren und das Kleinhirn nicht immer so weit angeschnitten war wie benötigt, wurden sie in dieser Arbeit durch weitere Objektträger mit fortlaufenden Schnitten durch das Mikrotom ergänzt. Durch das Rotationsmikrotom wurden 7µm dicke Serienschnitte erstellt, im Wasserbad bei 42 °C gestreckt und auf die silanisierten Objektträger aufgezogen. Hierbei wurden immer 5 Schnitte auf einem Objektträger

platziert, die mit fortlaufender Objektträger-Nummer beschriftet waren. Anschließend wurden die Schnitte bei 70 °C im Inkubator getrocknet.

Auf diese Weise standen ca. 50-60 Objektträger pro Tier zur Verfügung, die einen fortlaufenden Querschnitt im sagittal angeordneten Hirn darstellten.

### 2.2.3 Giemsa-Färbung

#### Ansatz der Giemsa-Lösung

Die Stammlösung wurde im Verhältnis 1: 10 mit destilliertem (dest.) Wasser verdünnt. Um ein Ausfällen der Farbstoffe zu vermeiden, wurde erst dest. Wasser in eine Glasküvette gefüllt und dann vorsichtig die filtrierte Stammlösung hinzugegeben. Für das Färben wurde anschließend die Lösung in eine Färbeschale gefüllt, sodass die Objektträgerhalter eingetaucht werden konnten. Die verwendete Giemsa-Lösung enthält Azur-Eosin-Methylenblau. Das Ergebnis dieser Färbung waren ca. 7-9 Farbstufen von blau und rot. Diese dienten in dieser Arbeit zur qualitativen Beurteilung der Purkinjzellschicht des Kleinhirns.

#### Durchgeführtes Färbeprotokoll

*Tabelle 4: Färbeprotokoll*

<b>Lösung</b>	<b>Zeit</b>	<b>Exakt</b>	<b>Vorgang</b>
Xylol	5 min	Nein	Entfernung des Paraffins
Xylol	5 min	Nein	Entfernung des Paraffins
Absoluter Alkohol (Isopropanol)	5 min	Ja	Rehydrierung
Absoluter Alkohol (Isopropanol)	5 min	Ja	Rehydrierung
96%iger Alkohol	5 min	Ja	Rehydrierung
90%iger Alkohol	5 min	Ja	Rehydrierung
80%iger Alkohol	5 min	Ja	Rehydrierung



<b>Lösung</b>	<b>Zeit</b>	<b>Exakt</b>	<b>Vorgang</b>
70%iger Alkohol	5 min	Ja	Rehydrierung
Destilliertes Wasser	5 min	Nein	Rehydrierung
Giemsa-Lösung frisch zubereitet	60 min	Ja	Färbung
Essigsäure-Wasser (4 Tropfen CH <sub>3</sub> COOH auf 200ml dest. Wasser)	wenige Sekunden bis 1 min	Ja	Differenzieren der Rottöne
96%iger Alkohol	wenige Sekunden bis 1 min	Ja	Differenzieren der Blautöne
Absoluter Alkohol (Isopropanol)	5 min	Ja	Dehydrierung
Absoluter Alkohol (Isopropanol)	5 min	Ja	Dehydrierung
Absoluter Alkohol (Isopropanol)	5 min	Ja	Dehydrierung
Xylol	5 min	Nein	Konservierung der Färbung
Xylol	5 min	Nein	Konservierung der Färbung
Xylol	5 min	Nein	Konservierung der Färbung
Eukitt Eindeckmedium	Individuelles Aushärten abwarten	Nein	Eindeckungsmedium

Zur Vorbereitung wurden die Objektträger mit den Hirnschnitten mithilfe von Xylol von Paraffinresten befreit und in absteigender Alkoholreihe rehydriert:

Jeweils 5 Minuten zweimal in Xylol, zweimal in Isopropanol als 100%igem Alkohol und jeweils einmal in 96%igem-, 90%igem-, 80%igem- und 70%igem Alkohol. Danach

wurden die Schnitte für 5 min in dest. Wasser abschließend rehydriert und für eine Stunde in verdünnter Giemsa-Stammlösung eingefärbt. Für eine Differenzierung der Rottöne (Azur-Eosin) wurden 2-3 Tropfen Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) in destilliertes Wasser gegeben, die anschließende Differenzierung der Blaufärbung erfolgte durch 96% Isopropanol. Die Färbungsintensität wurde subjektiv entschieden und variierte damit unter den Objektträgern, stets jedoch innerhalb eines Zeitfensters von wenigen Sekunden. Eine anschließende Konservierung der Färbung, nach Dehydrierung in dreimal 5 Minuten 100% Isopropanol und dreimal ca. 5 Minuten Xylol, erfolgte durch Abdeckung mit „Eukitt“ als Eindeckungsmedium und Deckgläschen.

#### **2.2.4 Streckenanalyse der Purkinjzellschicht und Purkinjzellzählung**

Für eine quantitative Analyse wurden JPEG-Bilddateien mittels MCID Elite™ 7.0 software (Imaging Research Inc., St. Catherines, Canada) akquiriert und durch ImageJ (Schneider et al., 2012) ausgewertet. Die Tiere wurden vor der Datenauswertung verblindet, sodass die Zuordnung der Tiere in die untersuchten Gruppen nicht mehr ersichtlich war. Erst nach vollständiger Auswertung aller Datensätze wurde die Gruppeneinteilung den Ergebnissen zugeordnet. Die Auswertung mithilfe von ImageJ erfolgte für jedes Bild durch eine Längenberechnung der Purkinjzellschicht und gleichzeitige Zählung der Purkinjzellen. Da Purkinjzellen multimorph erscheinen können, wurden durch die Schnitte A, C und E drei benachbarte Kleinhirnschnitte desselben Objektträgers im Abstand von zweimal  $7\mu\text{m}$  entnommen, untersucht und letztlich der Mittelwert gebildet.

Es wurden ausschließlich Purkinjzellen als vital gewertet, sofern der Zellkern (Nukleus) sowie der Kernkörpercheninhalt (Nukleolus) als Ausdruck für DNA, RNA und Proteinen einwandfrei abgebildet wurde. Sobald eines dieser beiden Kriterien nicht erfüllt war, wurde die Zelle nicht gewertet und damit nicht gezählt. Das Auswahlverfahren ist in Abbildung 5 verdeutlicht. Die mit einem Pfeil markierten und damit gewerteten Zellen zeigen einen Zellkern und Teile des Kernkörperchens. Jene mit X-markierten sind nicht gewertet worden, wenn Zellkern oder Inhalt nicht abgebildet wurden.

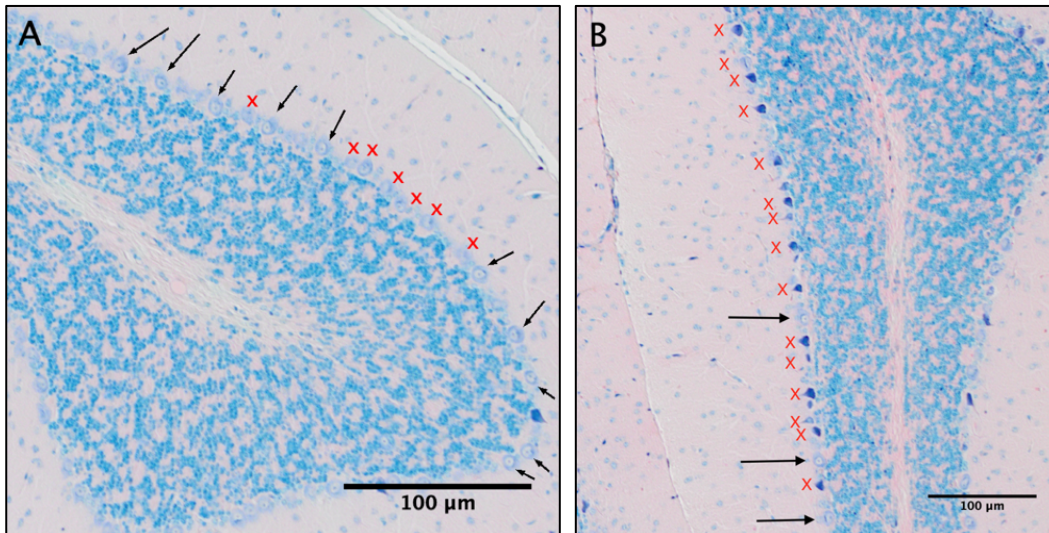


Abbildung 5: Auswertung der Purkinjezellen im Querschnitt durch das Stratum purkinjense des Kleinhirns. Die letztlich gewerteten Purkinjezellen sind mit einem Pfeil, die nicht gewerteten Zellen sind mit einem roten X markiert.

### 2.2.5 Die Funktionsweise der MRT und Parameter für diese Arbeit

Die Magnetresonanztomographie (MRT) als ein bildgebendes Verfahren wird zur diagnostischen Darstellung von anatomischen Strukturen verwendet. Vorteil der MRT Diagnostik ist die mögliche Beurteilung des Weichteilgewebes des Kopfes. Der Kontrast und die Detektionssensitivität führen hier zu einer höheren Auflösung als bei der Röntgenstrahlen-unterstützten Computer-Tomographie (Budinger & Lauterbur, 1984). Bereits in den 70er Jahren begann die medizinische Nutzung der ortsauflösenden Kernresonanz zur Beurteilung von anatomischen Strukturen in Schnittbildern in mehreren frei wählbaren Raumebenen. (Brownell et al., 1982). Zum heutigen Stand hat sich die MRT in der Erforschung neurologischer Erkrankungen wie der Niemann-Pick Erkrankung Typ C, aber auch für die ALS etabliert (Totenhagen et al., 2017; Tu et al., 2019). Die Kernmagnetresonanz fundiert auf der Eigenschaft von Atomkernen mit ungerader Nukleonenzahl. Das Wasserstoffproton ( $H^+$ ) eignet sich hier besonders zur Erklärung der Funktionsweise, da es im menschlichen Körper am häufigsten ist. Die Protonen besitzen einen sogenannten Kernspin (einen Eigendrehimpuls). Hierbei bewegt sich die positive Ladung mit einer stoffspezifischen Geschwindigkeit um die eigene Achse und induziert ein eigenes magnetisches Dipolmoment. Besteht nun ein starkes äußeres Magnetfeld richten sich die magnetischen Dipole entlang von Feldlinien aus. Dies kann parallel sowie antiparallel erfolgen. Für die Ortskodierung werden zum

äußeren Magnetfeld während der Messsequenzen durch Gradientenspulen Magnetfelder mit kleinerer Feldstärke in den drei Raumebenen überlagert. Für die Bilderzeugung regt ein definierter Hochfrequenz-Impuls Protonen an. Diese kehren nach der Anregung in ihren Ausgangszustand zurück, was als Relaxation bezeichnet wird. Diese Relaxationsprozesse werden mathematisch als Zeitkonstanten T1 und T2 bezeichnet. Die Bildkontraste sind von den unterschiedlichen Gewebeparametern T1, T2, der Protonendichte – die dem Wassergehalt des Gewebes entspricht – und den Sequenzparametern TR und TE sowie von dem Sequenztyp abhängig. Die Gewichtung der entstandenen Sequenz wird je nach ausschlaggebendem Gewebeparameter bestimmt (z. B. Knochen, Gehirn, Flüssigkeiten). Dunkle Strukturen werden in MRT-Aufnahmen auch als hypointens bezeichnet. In der T1-gewichteten Sequenz, durch kurze TR und TE, erscheinen Gewebe mit einer kurzen T1 (z. B. weiße Hirnsubstanz, Fett) hell (hyperintens). In der T2-gewichteten Sequenz sind längere TR und TE kennzeichnend. Hier erscheinen Gewebe mit einer langen T2, z. B. Wasser oder Blut hyperintens und Gewebe mit kurzer T2, z. B. Muskulatur, hypointens. Besonders genutzt wird diese Sequenz für die Beurteilung von Liquor, Ödemen und Zysten, da Wasser die längste T2 hat, wodurch diese Strukturen hyperintens erscheinen (Reiser et al., 2004, 2006).

Für die Akquirierung der in dieser Arbeit verwendeten Bilder wurde ein 7-Tesla Kernspintomograph, Model Clinscan 70/30 USR der Firma Bruker verwendet. Dieser ist ein MRI und MRS Scanner, der speziell für Kleintierstudien nutzbar ist. Das zugrundeliegende System basiert auf der syngo Technologie der Firma Siemens und ist klinisch orientiert. Für die Bildausrichtung wurden die Tiere auf dem Bauch gelagert und kopfwärts im Isozentrum des Scanners positioniert. Folgende Parameter wurden für die Erhebung der Sequenzen bei der axialen, sagittalen und coronaren Bildgebung der Mäusegehirne verwendet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Parameter der MRT-Sequenzen

4 Kanal Mauskopfspule (Bruker Phased Array Mouse Brain Coil 2x2)	
T2-gewichtete Turbo Spin Echo Sequenz (TSE)	TR 2750 ms, TE 46 ms, FOV 25 mm, Bildmatrix 256*256, Schichtdicke 0,7 mm, Flip Winkel 180°
T2-gewichtete Turbo Spin Echo 3D Sequenz (isotrop)	TR 2500 ms, TE 29 ms, Fov 25 mm, Matrix 256x256, Schichtdicke 0,10 mm (3D Block Dicke 7,20 mm), Flipwinkel 108°, Voxelgröße 0,10x0,10x0,10

## 2.2.6 Statistische Auswertung und Bestimmung der Signifikanz

Die erhobenen Daten beinhalten zum einen eine Auswertung der Zellzahl von Purkinjezellen in histologischen Kleinhirnschnitten, akquiriert durch ImageJ und zum anderen eine graphisch gemessene Auswertung des Querdurchmessers und der Länge von Kleinhirnen durch den HOROS DICOM Viewer. Die durchgeführte Flächenanalysen der histologischen sowie magnetresonanztomographischen Bilder wurde mit selbigen Programmen untersucht.

Die Datensätze wurden zunächst in die Software GraphPad-Prism 4.0 eingefügt. Für alle Signifikanzprüfungen wurde eine One-Way-ANOVA (analysis of variance) durchgeführt. Dieses Statistikverfahren vergleicht jede einzelne Datenreihe untereinander sowie miteinander. Hiermit kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob Interaktionen innerhalb sowie zwischen den Datengruppen bestehen. Im Einzelnen hieß das für die histologische Untersuchung der Purkinjezellschicht die Prüfung auf signifikante Unterschiede in der Anzahl der Purkinjezellen. Für den Querdurchmesser und die Länge im MRT sowie für die vergleichenden Flächenberechnungen wurden Unterschiede in der Streckenbestimmung und in der Fläche untersucht. Durch unterschiedliche Gruppen bei der histologischen- und MRT-Flächenberechnung wurde für Einzelgruppenvergleiche ein Einstichproben-t-Test zusätzlich zur One-Way-ANOVA verwendet. Dieser Einstichprobentest ist besonders für Einzelgruppen geeignet, während bei der ANOVA mindestens drei Gruppen miteinander verglichen werden müssen. Für die histologische ANOVA wurde zudem der Turkey's-Multivergleichstest als ANOVA-Verfahren gewählt. Die MRT-ANOVA wurde durch die geringere Anzahl an Gruppen

durch einen Dunnett-Multivergleichstest berechnet. Hierbei wurden die Gruppen stets mit der Wildtypgruppe verglichen. Durch eine anschließende Bonferroni-Korrektur-Testung konnte eine Aussage darüber getroffen werden, durch welche Faktoren die Unterschiede entstehen und damit auch, ob sie signifikant sind. Für eine nachvollziehbare Beurteilung der Unterschiede wurden hier standardisierte Signifikanzschwellen von  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) benutzt. Bei Erreichen der Schwelle von  $p < 0,05$  wurde ein Wert als signifikant angegeben.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Histologische Analyse der Purkinjezellschicht**

Wie in Kapitel 2.1.3 des Methodenteils beschrieben, wurden für die histologische Analyse der Purkinjezellschicht die bereits vorhandenen Kleinhirnschnitte herangezogen und ergänzt. Neu angefertigt wurden Mikrotom-gestützte Schnitte aller acht Mäuse der Endstadium-Gruppen (4x SOD1-Wildtyp/PACAP-Wildtyp und 4x SOD1-Wildtyp/PACAP-Knockout). Die Auflistung jeglicher Mäuse mit ihren Identifikationsnummern (ID) ist in Tabelle 9 im Anhang dargestellt. Nach dem Anfertigen der Gewebeschnitte und der Färbung durch Giemsa-Lösung sahen die Objektträger mit den Mausgehirnen wie in Abbildung 6 am Beispiel der Maus E4318 dargestellt aus. Mithilfe des Mikroskops sowie der zugehörigen Digitalkamera und Software cellSens wurden diese Bilder als JPEG-Bilddatei fotografiert und gespeichert. Zur Orientierung sind wichtige Hirnstrukturen gekennzeichnet. Durch die sagittale Schnittführung waren verschiedene Hirnabschnitte in der rostro-caudalen Achse auf einem Schnitt vorhanden. Größe und Vorhandensein bestimmter Hirnareale, z. B. Hippocampus (HC) und Ncl. n. facialis (VII), dienten der Auswahl von Einzelschnitten für die histologische Analyse des Kleinhirns.

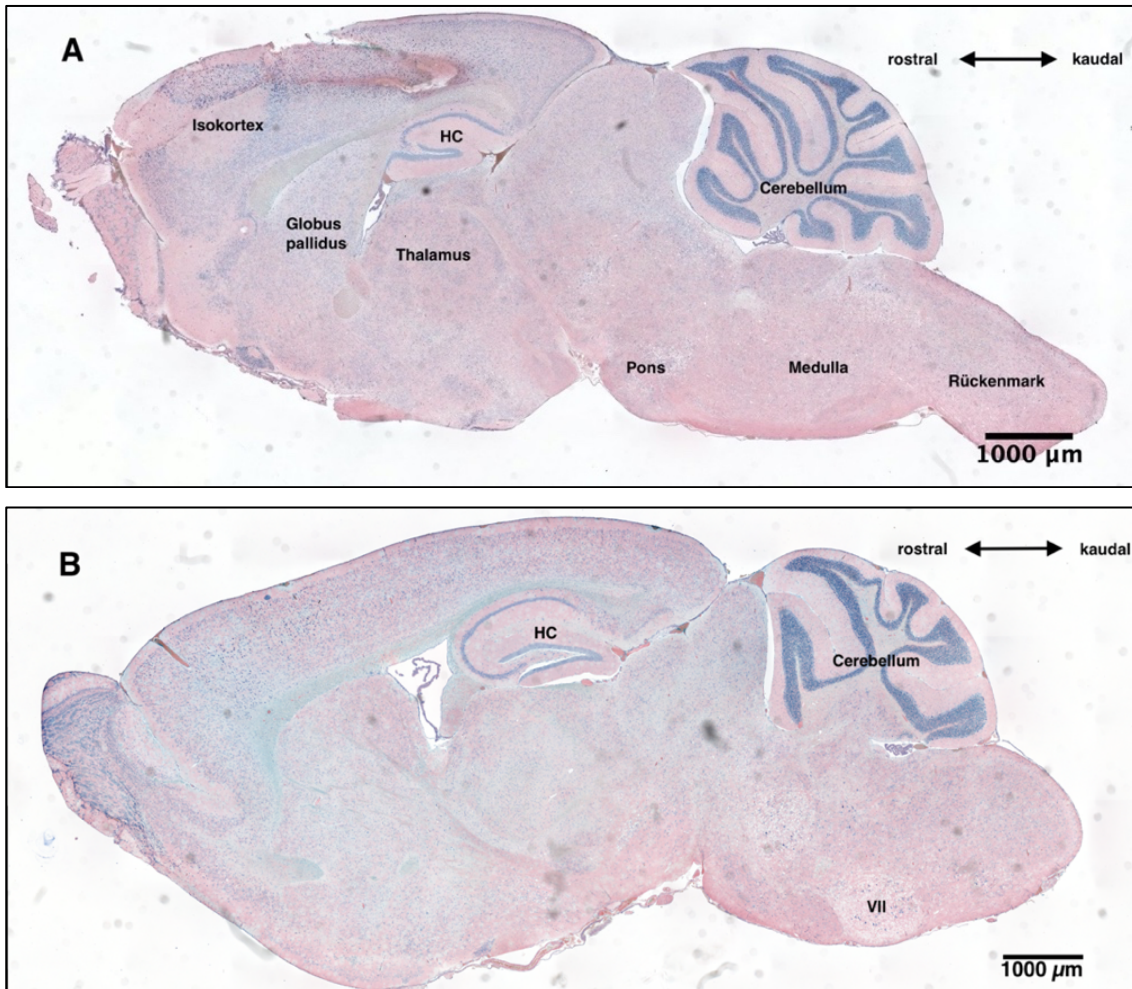


Abbildung 6: Gewebeschnitte des Hirns von Maus E4318 nach Giemsa-Färbung. Die medio-sagittalen Schnitte in A und B lassen verschiedene Hirnareale in der rostro-caudalen Achse erkennen. Der Anschnitt von z. B. dem Ncl. n. facialis diente zur Auswahl cerebellärer Schnitte für die weiterführende Analyse. HC = Hippocampus, VII = Ncl. n. facialis.

Durch das Schneiden des Mikrotoms entstanden pro Tier ca. 50-60 Objektträger. Pro Tier wurden drei Objektträger mit jeweils fünf Hirnschnitten histologisch untersucht. Die jeweiligen Schnitte auf einem Objektträger wurden mit den fortlaufenden Buchstaben A-E bezeichnet. Letztendlich ausgewählt für die Analyse wurden für jeden Objektträger die Schnitte A, C und E. Sofern einer der Schnitte A, C oder E unbrauchbar war, z. B. durch Falten im Gewebe, Schnitt- oder Färbeartefakte, wurde stattdessen Schnitt B oder D analysiert. Durch die Auswahl von Schnitt A, C und E und der Schnittführung des Mikrotoms mit 7µm konnte auf Objektträgererebene pro Tier ein größerer Durchschnitt durch das Kleinhirn gewährleistet werden. Um einen größtmöglichen Abstand zwischen den Objektträgern und damit so viel wie möglich vom Kleinhirn des jeweiligen Tieres zu untersuchen, wurden unter den ca. 50-60 Objektträgern immer ein Objektträger aus den



Nummern 0 bis 20, einer um die Nummer 30 sowie einer zwischen den Nummern 40 bis ca. 60 ausgewählt. Diese Auswahl war nicht rein zufällig. Es wurden im jeweiligen Zielnummerbereich bestimmte Objektträger mit optimaler Anfärbung und vergleichbarer Lage in der medio-sagittalen Achse bevorzugt. Dementsprechend wurden beschädigte sowie variabel schlechter angefärbte Objektträger nicht ausgewählt.

Für jedes Tier wurde zuallererst eine Übersichtsaufnahme des Kleinhirns in der sagittalen Schnittführung bei einer Vergrößerung von 4x angefertigt. Diese Bildführung ist in Abbildung 7 anhand der Maus mit der ID E4318 dargestellt.

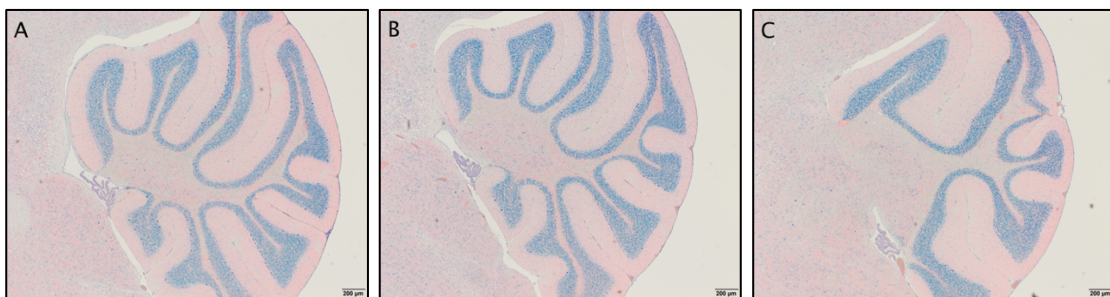


Abbildung 7: Darstellung des Kleinhirns von Maus E4318, Objektträger 24 (A), 31 (B) und 54 (C) nach Giemsa-Färbung. Das stark blau gefärbte Band entspricht der Körnerzellschicht.

Anschließend wurden ca. zehn Fotos der gesamten Purkinjezellschicht des Mauskleinhirns angefertigt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die gesamte Zellschicht abgebildet wurde und keine später ausgemessene Strecke doppelt gezählt wurde. So entstanden (von A nach L) am Beispiel des Tieres mit der ID E4318, in Abbildung 8 dargestellt, zwölf Einzelbilder mit einer 10x Vergrößerung. Anhand dieser Bilder wurde die Purkinjezellschicht später analysiert.

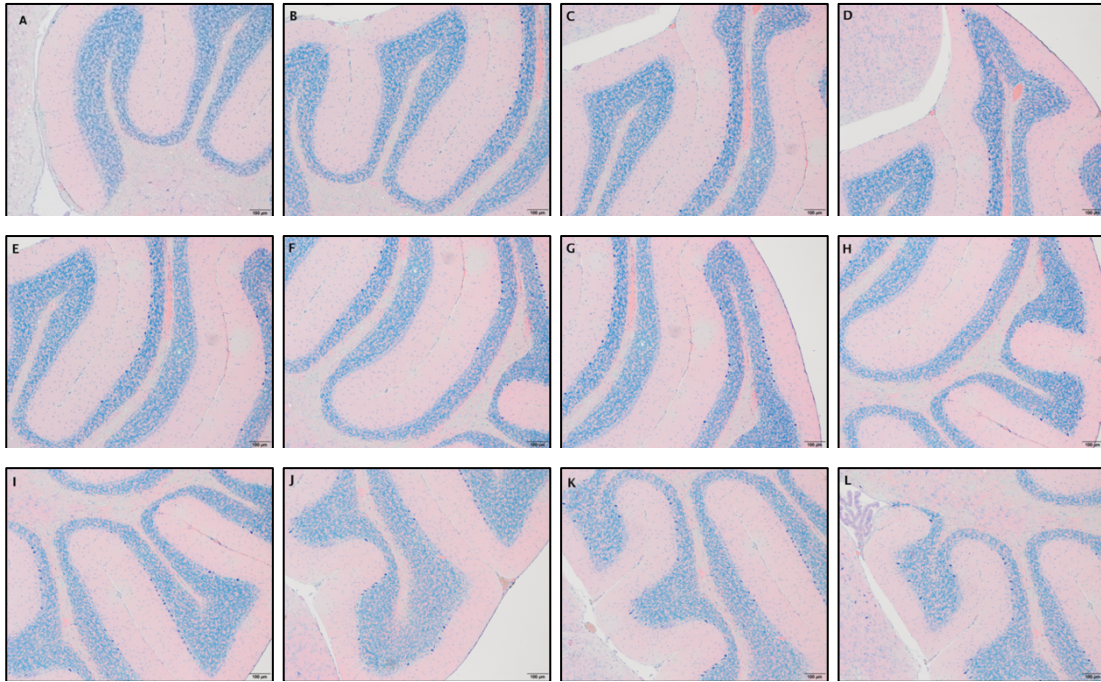


Abbildung 8: Bildreihe (A-L) der Purkinjzellschicht von Tier E4318, OT24, Schnitt A zur Quantifizierung der Purkinjzellen. Giemsa-Färbung.

Insgesamt wurden 32 Tiere zu zwei Messzeitpunkten in die Arbeit eingeschlossen. Resultierend wurden jeweils 16 Tiere für den frühen Zeitpunkt p60/70 und dem Endstadium im Krankheitsverlauf untersucht. Pro Messzeitpunkt eingeschlossen wurden jeweils vier Wildtyp-Tiere (WT/WT), vier Tiere mit alleiniger SOD1-Mutation (SOD1/WT), vier Tiere mit PACAP-Knockout (WT/KO) und vier Tiere mit beiden Faktoren (SOD1/KO). Von allen eingeschlossenen Tieren wurden jeweils, aus den ca. 50 bis 60 erstellten Objektträgern (OT), drei OT nach den oben beschriebenen Kriterien ausgesucht. Aus den daraus resultierenden 96 OT mit jeweils fünf Gewebeproben wurden erneut drei Schnitte ausgesucht und von den mitabgebildeten Kleinhirnen und der Purkinjzellschicht jeweils durchschnittlich ca. acht Bilder digitalisiert und untersucht. In der Summe wurden für den histologischen Teil dieser Arbeit 2310 Purkinjzellschicht-Bilder analysiert. Untersucht wurden Mäuse dieser Gruppen zum Tag 60/70 (p60/70) und zum Endstadium-Zeitpunkt (p120). Die beschriebenen Gruppen sind nachfolgend in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Mausgruppen für die histologische Purkinjzellanalyse

<b>Tag 60/70 (p60/70)</b>	<b>Endstadium (p120)</b>	<b>Erklärung</b>
Wildtyp/Wildtyp (WT/WT) (n = 4)	Wildtyp/Wildtyp (WT/WT) (n = 4)	Keine SOD1-Mutation/PACAP vorhanden
SOD1/Wildtyp (SOD1/WT) (n = 4)	SOD1/Wildtyp (SOD1/WT) (n = 4)	SOD1-Mutation/PACAP vorhanden
Wildtyp/PACAP-Knockout (WT/KO) (n = 4)	Wildtyp/PACAP-Knockout (WT/KO) (n = 4)	Keine SOD1-Mutation/PACAP- Knockout
SOD1/PACAP-Knockout (SOD1/KO) (n = 4)	SOD1/PACAP-Knockout (SOD1/KO) (n = 4)	SOD1-Mutation/PACAP- Knockout

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung mittels One-Way-ANOVA sind in Tabelle 9 im Anhang enthalten und eine graphische Darstellung der Unterschiede als Box-Plot-Diagramm ist in Abbildung 11 zu sehen. Die One-Way-ANOVA untersucht in diesem histologischen Teil der Arbeit die monofaktorielle Hypothese der Purkinjzelldegeneration der Mäuse zwischen den Genotypen separat zu den zwei Messzeitpunkten (p60/70 und Endstadium). Der Faktor Geschlecht der Tiere wurde in die statistische Auswertung nicht mit einbezogen, da eine unterschiedliche Anzahl an männlichen und weiblichen Tieren zur Verfügung stand. Resultierend wurde eine Two-Way ANOVA für diese Analyse abgelehnt. Eine ANOVA-Signifikanzprüfung zwischen den Messzeitpunkten (p60/70 und Endstadium) wurde ebenfalls nicht durchgeführt, da ein genereller Anstieg zu deutlich höheren Werten in allen Gruppen zum Endstadium-Zeitpunkt zu beobachten war, der einen Vergleich unmöglich machte. Zur graphischen Darstellung des jeweiligen histologischen Schnitts, der am ehesten dem Mittelwert der Box-Plot Analyse für jede Gruppe entsprach, ist nachfolgend für jede der Gruppen zum Tag p60/70 sowie p120 (Endstadium) ein Bild pro Tier ausgewählt und in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt. Aufgrund der Bildakquirierungsmethode überlappten sich die Ausschnitte der abgebildeten Purkinjeschichten. Daher ist in den hier gezeigten Beispielen markiert, welcher Abschnitt des jeweiligen Bildes ausgewertet (rote

Linie) und welche Purkinjezellen gewertet wurden (mit einem Pfeil markiert). Die Anzahl der gezählten Purkinjezellen ist in Tabelle 7 nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 7: Mittelwerte für die graphische Darstellung in der Box-Plot-Analyse

Schnitt	Genotyp	Messzeitpunkt	Gezählte Purkinjezellen
E4436, OT33, Schnitt a, Bild 3	WT/WT	p60/70	11
E4444, OT29, Schnitt c, Bild 1	WT/KO	p60/70	12
E4452, OT22, Schnitt a, Bild 5	SOD1/WT	p60/70	9
E4460, OT32, Schnitt e, Bild 3	SOD1/KO	p60/70	7
E4327, OT46, Schnitt c, Bild 6	WT/WT	Endstadium	15
E4348, OT45, Schnitt e, Bild 4	WT/KO	Endstadium	14
E4321 OT18, Schnitt a, Bild 4	SOD1/WT	Endstadium	11
E4318, OT24, Schnitt c, Bild 6	SOD1/KO	Endstadium	10

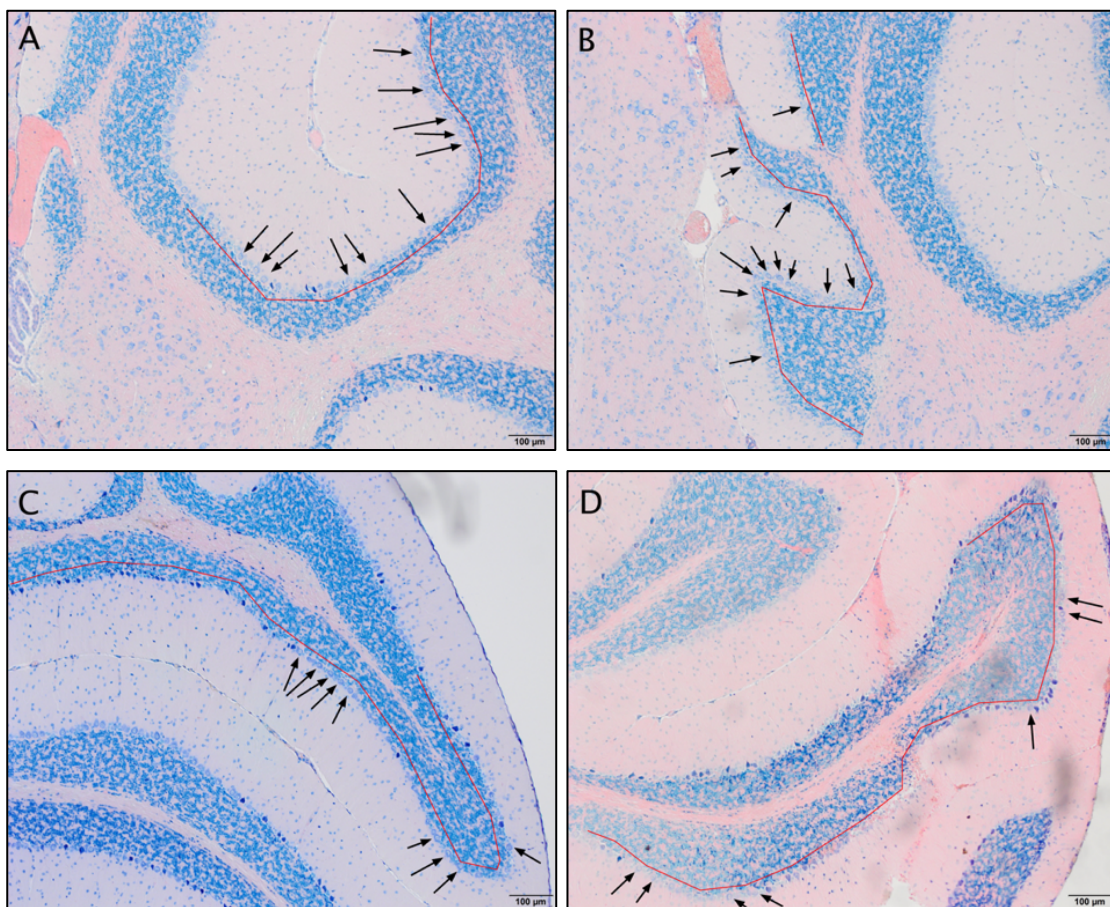


Abbildung 9: Repräsentative Bilder der in Tabelle 7 aufgeführten Mittelwerte vom Messzeitpunkt P60/70. Von links nach rechts (A-D): WT/WT (A), WT/KO (B), SOD1/WT (C), SOD1/KO (D). Die rote Linie markiert die analysierte Strecke der Purkinjezellschicht und die Pfeile die gezählten Purkinjezellen.

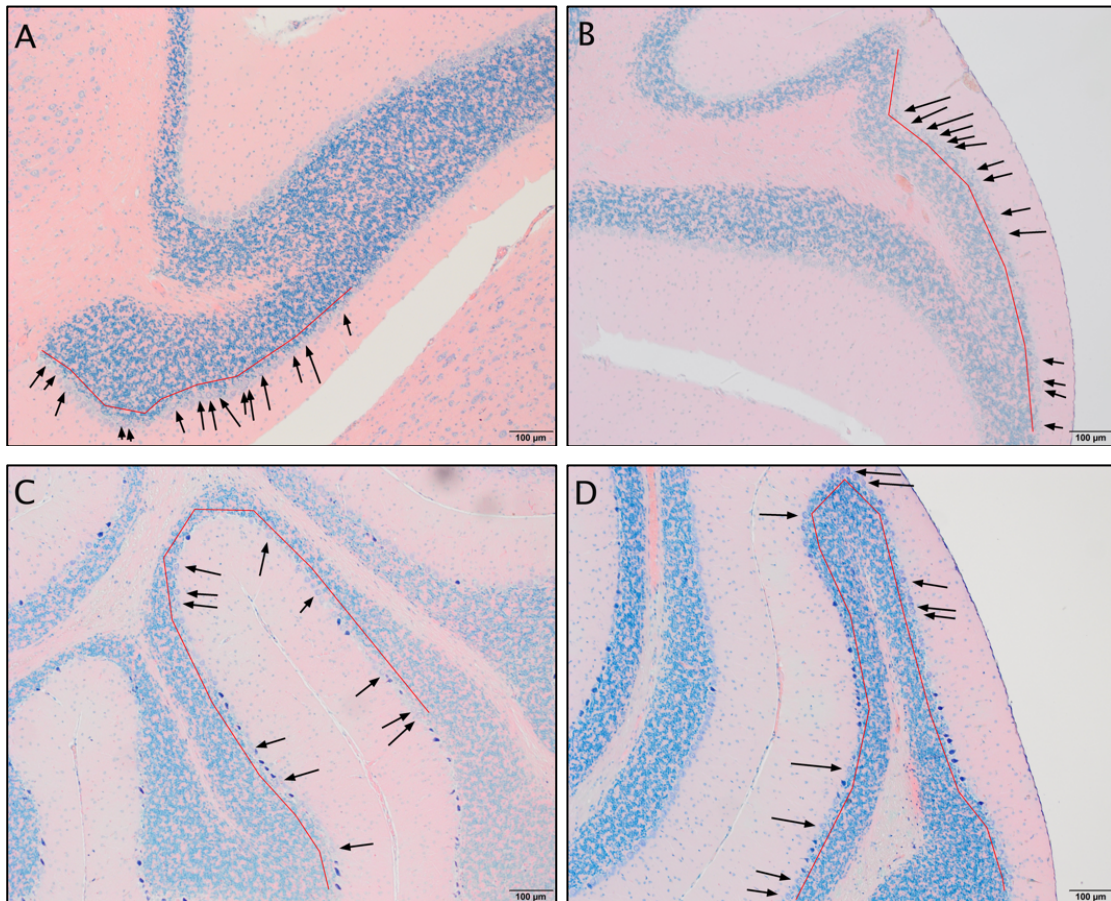


Abbildung 10: Repräsentative Bilder der in Tabelle 7 aufgeführten Mittelwerte vom Messzeitpunkt Endstadium. Von links nach rechts (A-D) WT/WT (A), WT/KO (B), SOD1/WT (C), SOD1/KO (D). Die rote Linie markiert die analysierte Strecke der Purkinjezellschicht und die Pfeile die gezählten Purkinjezellen.

Zum p60/70-Zeitpunkt zeigten die Gruppe WT/WT im Mittelwert (M) 10,34 Purkinjezellen (PZ) pro mm und die Gruppe WT/KO (M = 11,05 PZ) mit einem Mittelwertsunterschied von -0,7050 (KI -3,175 bis 1,765) keine signifikanten Unterschiede. Bei gleich alten Tieren die eine SOD1-Mutation trugen (SOD1/WT), lagen die durchschnittlichen PZ bei M = 8,90 PZ. In der One-Way-ANOVA zeigte sich mit einem Mittelwertsunterschied von 1,443 (KI -1,028 bis 3,913) im Vergleich von WT/WT vs. SOD1/WT kein signifikanter Unterschied im PZ-Mittelwert. In der Vergleichsgruppe WT/KO p60/70 (M = 11,05 PZ) vs. SOD1/KO p60/70 (M = 8,06 PZ) zeigte sich in der One-Way-ANOVA für Mäuse mit zusätzlicher SOD1-Mutation, bei gleichzeitigem PACAP-Knockout, mit einem Unterschied von 2,985 (KI 0,5145 bis 5,455) und somit \* ( $p < 0,05$ ) ein signifikanter Unterschied. Der Mittelwertsunterschied von SOD1/WT p60/70 (M = 8,90 PZ) vs. SOD1/KO p60/70 (M = 8,06 PZ) zeigte mit 0,8375 (KI -1,633

bis 3,308) keine Signifikanz für den zusätzlichen PACAP-Knockout bei bestehender SOD1-Mutation.

Zum Zeitpunkt Endstadium lagen in der Gruppe WT/WT  $M = 15,21$  PZ vor. Gleichaltrige Tiere der Gruppe WT/KO End zeigten im Mittelwert  $14,44$  PZ. In der ANOVA zeigte sich mit einem Unterschied von  $0,7650$  (KI  $-3,652$  bis  $5,182$ ) keine Signifikanz. Der Vergleich von WT/WT End ( $M = 15,21$  PZ) vs. SOD1/WT End ( $M = 11,08$  PZ) zeigte mit einem Mittelwertsunterschied von  $4,128$  (KI  $-0,2895$  bis  $8,544$ ) keine signifikanten Unterschiede für die alleinige SOD1-Mutation. Im Vergleich der Gruppe WT/KO End ( $M = 14,44$  PZ) vs. SOD1/KO End ( $M = 10,05$  PZ) zeigte sich in der One-Way-ANOVA bei einem Wert von  $4,390$  (KI  $0,3979$  bis  $8,382$ ) kein signifikanter durchschnittlicher Mittelwertsunterschied für die zusätzliche SOD1-Mutation bei bestehendem PACAP-Knockout. Bei gleichaltrigen Mäusen mit bestehender SOD1-Mutation und PACAP-Knockout; SOD1/KO End ( $M = 11,08$  PZ) vs. SOD1/WT End ( $M = 10,05$  PZ) zeigte sich in der ANOVA ein Mittelwertsunterschied von  $1,028$  (KI  $-3,389$  bis  $5,444$ ) und war damit nicht signifikant für den zusätzlichen PACAP-Knockout bei bestehender SOD1-Mutation.

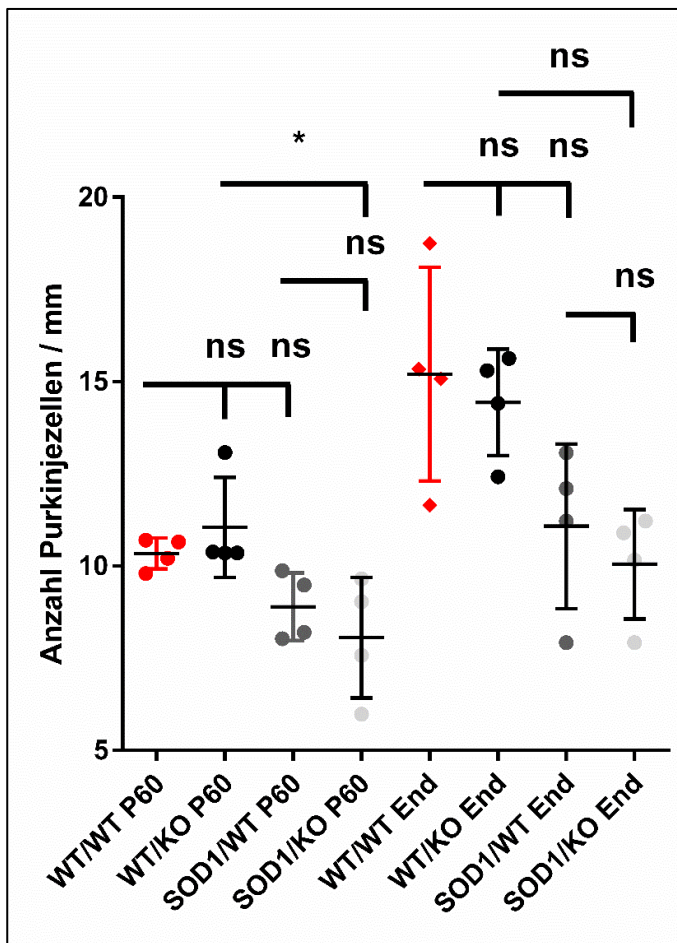


Abbildung 11: Box-Plot-Diagramm der Zählungen der Purkinjezellen zum Zeitpunkt p60/70 sowie Endstadium (Tag 120). Die dargestellten vier Punkte repräsentieren die Mittelwerte der vier Tiere. Das Signifikanzniveau wurde auf \* ( $p < 0,05$ ) festgelegt und die statistische Analyse mit einer One-Way-ANOVA durchgeführt.

### 3.2 MRT-Auswertung des Kleinhirn Querdurchmessers und der Länge

Wie unter Kapitel 2.2.5 im Methodenteil erläutert, wurde für die Bildgewinnung ein, speziell für Kleintierstudien nutzbarer, 7-Tesla-Kernspintomograph (Model Clinscan 70/30 USR der Firma Bruker) verwendet. Die Sequenzparameter, die bei der axialen, sagittalen und coronaren Bildgebung der Mäusegehirne verwendet wurden, sind in Tabelle 5 im Methodenteil angegeben. Für die coronare MRT-Schnittführung wurden der Querdurchmesser und die Länge in mm vermessen und dargestellt (nachfolgend in Abbildung 12). Der Querdurchmesser als größte Stelle der Hemisphärenausdehnung wurde als hellblaue Linie, die Länge als größte Ausdehnung in der vermalen Mittellinie als lila Linie markiert. Die durchgeführte Streckenmessung erfolgte durch den „DICOM

Viewer Horos“ mit einem Lineal-Tool und die Ergebniswerte sind in Tabelle 10 im Anhang dargestellt. Mithilfe dieser Daten wurde eine graphische Darstellung der Auswertung als Box-Plot-Diagramm durchgeführt und ist hier nachfolgend in Abbildung 13 zu finden.

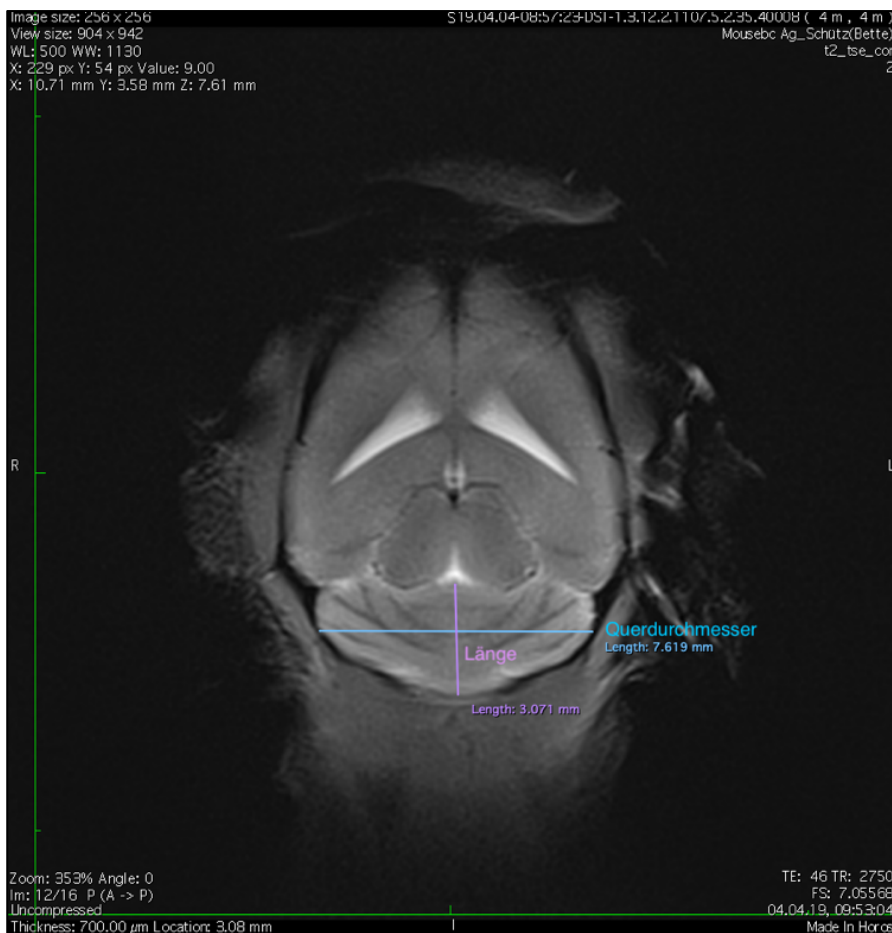


Abbildung 12: Magnetresonanztomographische Berechnung des Querdurchmessers (hellblau markiert) und der Länge des Kleinhirns (lila markiert) am Beispiel für das Tier K343.

Für die magnetresonanztomographische Untersuchung des Kleinhirn-Querdurchmessers und der Länge wurden in dieser Arbeit 24 Mäuse beider Geschlechter aus den Gruppen WT/WT (p60/70), WT/KO (p60/70), SOD1/WT (p60/70) sowie SOD1/WT (Endstadium; kurz: End) verglichen. Es wurden keine Tiere mit gleichzeitiger SOD1-Mutation und PACAP-Knockout (SOD1/KO) zum Zeitpunkt p60/70 sowie Endstadium eingebunden, da diese Datensätze nicht vorhanden waren und keine neuen Tiere gezüchtet werden konnten. Die Datensatzanalyse von Tieren am Tag 60/70 gilt hier wieder als erster Messzeitpunkt, der zweite Messzeitpunkt der Endstadium-Gruppe ist Tag 120. Die für



die Arbeit verwendeten Datensätze der Mausgehirne lagen zum Teil bereits vor und wurden mit Genehmigung von Dr. med. dent. Carolin Kresse aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie, Marburg ergänzt. Somit wurden folgende Gruppen untersucht:

*Tabelle 8: Mausgruppen für die MRT-Berechnung des Querdurchmessers und der Länge zum Messzeitpunkt p60/70 und Endstadium (p120)*

<b>Tag 60/70 (p60/70)</b>	<b>Endstadium (p120)</b>
Wildtyp/Wildtyp (n = 6)	Wildtyp/Wildtyp nicht vorhanden
SOD1/Wildtyp (n = 6)	SOD1/Wildtyp (n = 7)
Wildtyp/PACAP-Knockout (n = 5)	Wildtyp/PACAP-Knockout nicht vorhanden

In der Gruppe WT/WT zum Zeitpunkt p60/70 betrug der durchschnittliche Querdurchmesser (QD) des Kleinhirns 7,816 mm. Vergleichend lag der QD in der gleichaltrigen Gruppe mit PACAP-Knockout (WT/KO p60/70) bei 7,636 mm. In der One-Way-ANOVA zeigte sich mit -0,1800 (KI -0,4219 bis 0,0619) damit kein signifikanter Mittelwertsunterschied. Im Vergleich der Gruppen WT/WT p60/70 (QD = 7,816 mm) vs. SOD1/WT p60/70 (QD = 7,518 mm) zeigte sich in der ANOVA ein Mittelwertsunterschied von -0,2980 (KI -0,5286 bis 0,0673) und war auf dem Signifikanzniveau von \*\* ( $p < 0,01$ ) ein nachweisbarer Größenunterschied für die alleinige SOD1-Mutation. Der Vergleich der Gruppe SOD1/WT p60/70 (QD = 7,518 mm) vs. SOD1/WT Endstadium (QD = 7,571 mm) erbrachte in der ANOVA mit 0,053 (KI -0,1692 bis 0,2752) keine signifikanten Ergebnisse.

Die durchschnittliche Länge des Kleinhirns (L) betrug in der Gruppe WT/WT zum p60/70 Zeitpunkt 3,315 mm. Im Vergleich zur gleichaltrigen Gruppe WT/KO p60/70 zeigte sich eine Länge von 3,067 mm. In der One-Way-ANOVA zeigte sich so ein Durchschnittsunterschied in der Länge von -0,2480 (KI -0,4450 bis 0,0510) und war auf dem Signifikanzniveau \* ( $p < 0,05$ ) signifikant für den alleinigen PACAP-Knockout. Für den Vergleich der Gruppe WT/WT p60/70 (L = 3,315 mm) vs. SOD1/WT p60/70 (L = 3,166 mm) konnte mit 0,1490 (KI -0,3368 bis 0,03881) kein signifikanter Längenunterschied dargestellt werden. Auch im Vergleich der Gruppe SOD1/WT p60/70 (L = 3,166) vs. SOD1/WT Endstadium (L = 3,203 mm) konnte mit 0,037 (KI -0,1440 bis 0,2180) kein signifikanter Mittelwertsunterschied bestätigt werden.

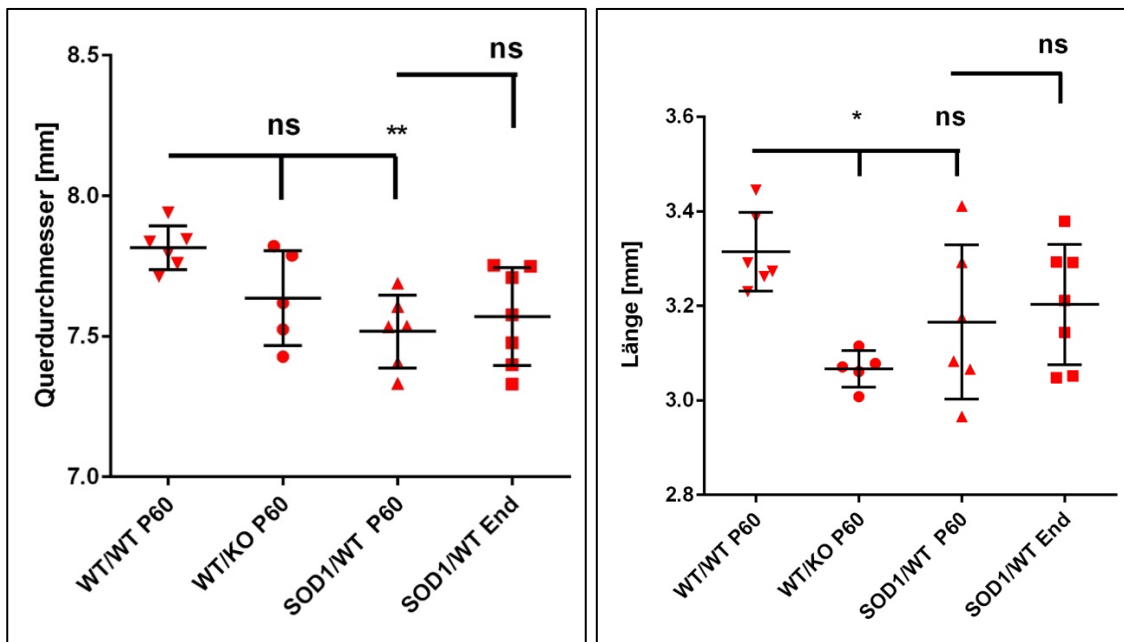


Abbildung 13: Box-Plot-Diagramm der Größenunterschiede des Maus-Kleinhirns in den Parametern Querdurchmesser und Länge. Das Signifikanzniveau ist auf \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,01$ ) festgelegt und die statistische Auswertung wurde mit einer One-Way-ANOVA durchgeführt.

### 3.3 Vergleich von histologischen- und MRT-Flächenberechnungen

Die ALS ist eine Motoneuronerkrankung, welche histologisch nicht in vivo untersucht werden kann und so eine Generierung von Gehirngewebe nur im bereits verstorbenen Patienten durchführbar ist. Anders sieht dies bei der radiologischen Schnittführung durch die Magnetresonanztomographie aus, welche bereits in der Neurologie für die in vivo Diagnostik diverser Erkrankungen, u.a. auch der ALS genutzt wird. Ob jedoch speziell das Kleinhirn im präsymptomatischen sowie symptomatischen Stadium eindeutig beurteilbar ist, ist derzeit wenig untersucht. Die Problematik der radiologischen Untersuchung ist zudem die eindeutig gröbere Schnittführung mit (wie hier für die akquirierten Daten genutzten) 7 Tesla Magnetspule im Vergleich zu einer 7 $\mu$ m Mikrotom-gestützten Schnittführung im Gewebe. Dadurch erscheint die MRT weniger aussagekräftig für die ALS. Mit dieser Arbeit wurde verglichen, in wie weit makroskopische Veränderungen, hier eine Atrophie des Kleinhirns, gleichwertig durch Histologie und Radiologie für den PACAP-Knockout im SOD1-Mausmodell beurteilt werden kann. Dadurch sollte zudem eine Aussage über die mögliche Nutzbarkeit der MRT bereits im frühen Stadium der ALS-Erkrankung getroffen werden. Hierzu wurde eine eingezeichnete Fläche von einem fotografierten, histologischen Kleinhirnschnitt mit

einem vergleichbaren Bild der Magnetresonanztomographie verglichen. Um die Vergleichbarkeit zu maximieren wurden Schnitte ausgewählt, auf denen ein deutlicher Anschnitt des Ncl. N. facialis sichtbar war. Die Flächenbegrenzung bildet der visuell abgebildete Umriss des Gewebes. Erneut wurde für die histologisch akquirierten Bilder das Programm „ImageJ“ verwendet, um eine Fläche zu berechnen. Für die MRT Schnittführung wurden die Datensätze wieder mit dem DICOM Viewer „HOROS“ ausgewertet und auch hier eine Fläche berechnet. Beide Verfahren sind nachfolgend in Abbildung 14 dargestellt. Für eine Beurteilung der Nutzbarkeit der histologischen und radiologischen (hier: MRT) Schnittführung wurden die Diagnostikverfahren in der Berechnung der Querschnittsfläche in  $\text{mm}^2$  des Kleinhirns in der sagittalen Ebene verglichen. Die in Tabelle 9 und 10 dieser Arbeit verwendeten Tiere und ihre Datensätze wurden erneut herangezogen. Ausgewertet wurden die Datensätze abschließend durch eine One-Way-ANOVA. Hierbei wurde auf Mittelwertsunterschiede der eingezeichneten Flächen des Kleinhirns geachtet und jeweils separat für die histologische- bzw. die MRT-Methode berechnet. Erneut wurde der erste analysierte Zeitpunkt als Tag p60/70 sowie der Tag 120 als Endstadium bezeichnet. Die Daten der Flächenberechnungen sind in Tabelle 11 und 12 im Anhang zu finden und die graphische Auswertung als Box-Plot-Diagramm ist nachfolgend in Abbildung 15 dargestellt. Auffällig bei der Analyse waren unterschiedliche Mittelwerte für die jeweiligen Verfahren. So lagen in der histologischen Flächenberechnung die Mittelwerte bei ca.  $3\text{-}4 \text{ mm}^2$ , in den MRT-Untersuchungen war der Mittelwert ca.  $8\text{-}11 \text{ mm}^2$ . Ursächlich sind hier Gewebeschrumpfungen zu vermuten, welche durch einen bei der Fixierung des Gewebes hervorgerufenen Wasserverlust und eine Proteindenaturierung begründet sind. Dadurch fällt das histologische Gewebe kleiner aus als im Nativpräparat der MRT-Untersuchung.

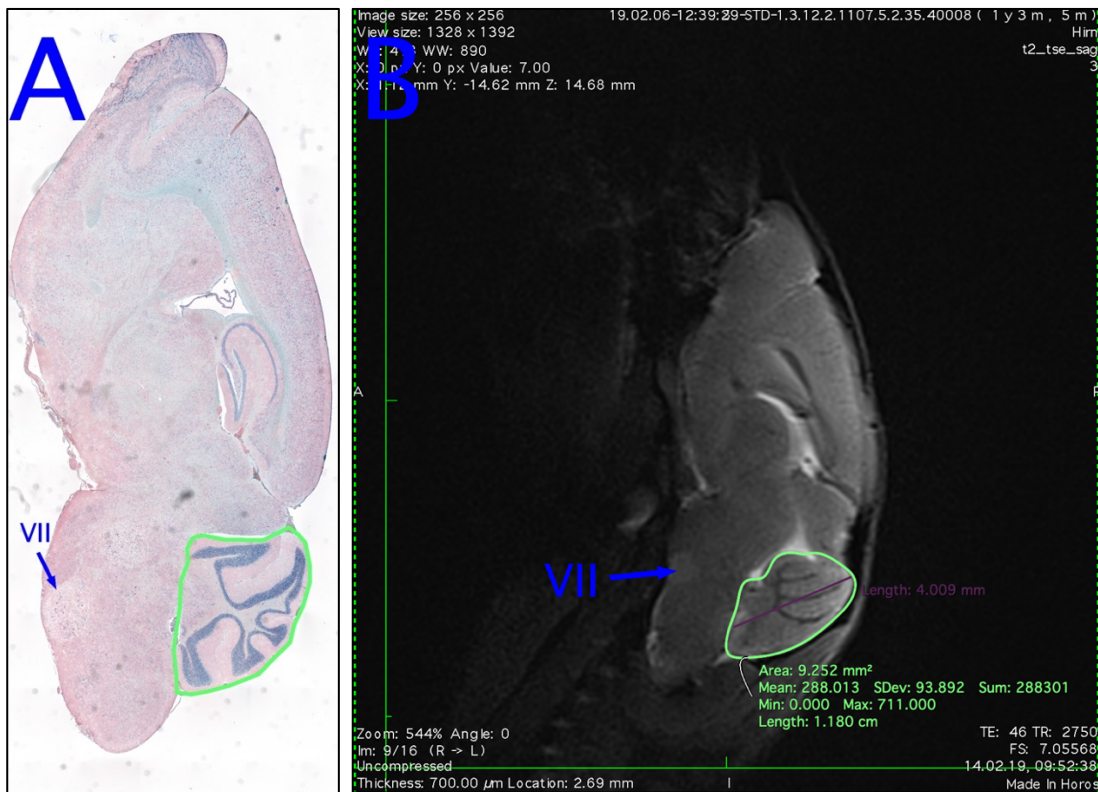


Abbildung 14: Flächenberechnung im histologischen (A) und magnetresonanztomographischen Schnittverfahren (B). Zur Orientierung der Schnittebene ist der Ncl. n. facialis (VII) mit einem blauen Pfeil und die Fläche des Kleinhirns hellgrün markiert.

In der histologischen Flächenberechnung zeigte sich in der Gruppe WT/WT zum Zeitpunkt p60/70 eine durchschnittliche Fläche (F) von 4,11 mm<sup>2</sup>. Bei gleichaltrigen Tieren der Gruppe WT/KO p60/70 zeigte sich eine durchschnittliche Fläche von 3,65 mm<sup>2</sup> und in der One-Way-ANOVA ein Mittelwertsunterschied von 0,4550 (KI 0,0658 bis 0,8442). Dieser ist mit \* (p < 0,05) signifikant. Ein signifikanter Unterschied in den Flächen WT/WT (F = 4,11 mm<sup>2</sup>) und SOD1/WT (F = 3,84 mm<sup>2</sup>) war für den p60/70 Zeitpunkt nicht nachzuweisen. Der Vergleich von SOD1/WT p60/70-Tieren (F = 3,84 mm<sup>2</sup>) vs. SOD1/KO p60/70 (F = 3,76 mm<sup>2</sup>) zeigte mit 0,0825 (KI -0,3067 bis 0,4717) keine signifikante zusätzliche Einwirkung des PACAP-Knockouts auf die histologisch nachweisbare Fläche. Auch für den Zeitpunkt Endstadium konnte im t-Test bei SOD1/WT End (F = 3,92 mm<sup>2</sup>) vs. SOD1/KO End (F = 3,89 mm<sup>2</sup>) mit 0,9364 (KI -0,9886 bis 0,9236) kein signifikanter Wert für den zusätzlichen PACAP-Knockout bei bestehender SOD1-Mutation nachgewiesen werden. Auch im t-Test von SOD1/WT p60/70 (F = 3,84 mm<sup>2</sup>) vs. SOD1/WT Endstadium (F = 3,92 mm<sup>2</sup>) zeigte sich für den

Vergleich von Frühstadium- mit Endstadium-SOD1-Tieren mit 0,8573 (KI -0,9325 bis 1,088) kein signifikanter Unterschied in der Fläche.

In der MRT-Flächenberechnung zeigte die WT/WT p60/70 Gruppe eine durchschnittliche Fläche von 10,38 mm<sup>2</sup>. Im Gegensatz dazu zeigten gleichaltrige WT/KO-Mäuse eine Fläche von 9,42 mm<sup>2</sup>, welche im Vergleich von WT/WT vs. WT/KO in der One-Way-ANOVA mit einem Mittelwertsunterschied von 0,9610 (KI 0,5602 bis 1,362) und \*\*\* (p < 0,001) einen signifikanten Unterschied für den alleinigen PACAP-Knockout bestätigten. Der Gruppenvergleich von WT/WT p60/70 (F = 10,38 mm<sup>2</sup>) vs. SOD1/WT p60/70 (F = 9,16 mm<sup>2</sup>) zeigte mit 1,225 (KI 0,8242 bis 1,626) und \*\*\*\* (p < 0,0001) einen signifikanten Unterschied für die alleinige SOD1-Mutation. Der t-Test-Vergleich der Gruppe SOD1/WT p60/70 (F = 9,16 mm<sup>2</sup>) vs. SOD1/WT Endstadium (F = 8,56 mm<sup>2</sup>) zeigte mit 0,2476 (KI -1,739 bis 0,5441) keine signifikanten Mittelwertsunterschiede zwischen den Messzeitpunkten.

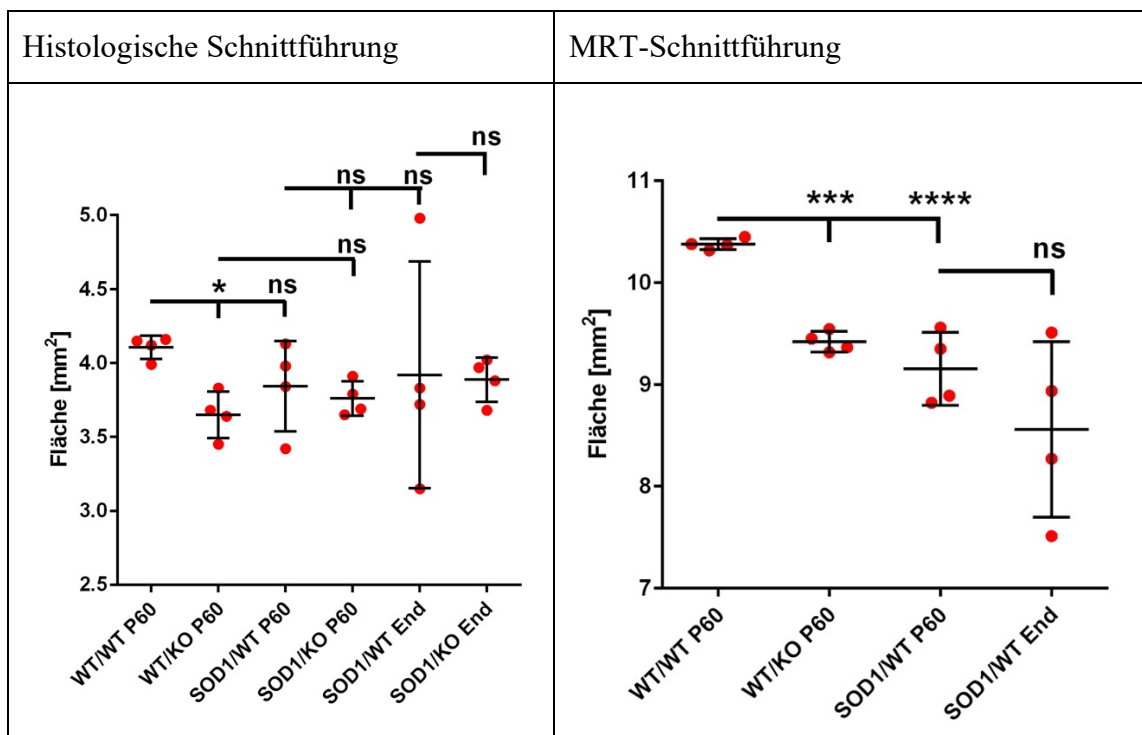


Abbildung 15: Ergebnisse der histologischen- und MRT-gestützten Flächenberechnung des Kleinhirns. Die Bezeichnung SOD1 steht für die SOD1 (G93A)-Mutation, KO steht für den PACAP-Knockout. Die beiden Messzeitpunkte sind als p60/70 und als End (abgekürzt für Tag p120; Endstadium) bezeichnet. Das Signifikanzniveau ist auf \* (p < 0,05), \*\*\* (p < 0,001) und \*\*\*\* (p < 0,0001) festgelegt und die statistische Auswertung wurde mit einer One-Way-ANOVA bzw. einem Einstichproben-t-Test durchgeführt.

## 4 Diskussion

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine neurodegenerative Erkrankung deren Hauptsymptom ein Verlust der Willkürmotorik ist, bedingt durch ein kontinuierliches Absterben motorischer Nervenzellen in Cortex, Hirnstamm und Rückenmark. Sie beschränkt sich jedoch nicht nur auf Motoneurone, sondern man geht davon aus, dass es sich bei der ALS um eine multisystemische Netzwerkerkrankung mit charakteristischer gestörter Konnektivität handelt. Obwohl bereits im 19. Jahrhundert von Jean-Martin Charcot zum ersten Mal beschrieben, gibt es bis zum heutigen Stand keine heilende Therapie der ALS und dass, obwohl zugrundeliegende molekulare Pathologien und zelluläre Prozesse fortwährend erforscht und beschrieben werden. Viele dieser Daten wurden aus Versuchen mit etablierten Tiermodellen entnommen. So können gezielt Gewebeproben im Verlauf der ALS Erkrankung zu verschiedensten Krankheitsstadien entnommen und untersucht werden. In dieser tierexperimentellen Arbeit wurde das etablierte SOD1 (G93A)-ALS-Mausmodell verwendet, welches in Bezug auf Motoneurondegeneration, immunologischen Pathologien und Ablauf der ALS-Erkrankung mit dem Menschen vergleichbar ist (Ringer et al., 2017). Basierend auf den Ergebnissen von Ringer et al. besitzt das Neuropeptid PACAP mögliche neuroprotektive sowie möglicherweise neuroinflammatorische Effekte auf Nervenzellen. Diese Ergebnisse bezogen sich jedoch nur auf Areale des Hirnstamms und Teile des Rückenmarks. Eine Aussage über das Kleinhirn im Laufe der ALS Erkrankung wurde nicht getroffen. Das Kleinhirn als wichtiges Verschaltungszentrum für feinmotorische, muskuläre Bewegungen könnte im Rahmen der neurodegenerativen ALS eine entscheidende Rolle spielen; es besitzt als alleinstehende Struktur des Gehirns bereits 50 Milliarden Neuronen, was 50 % der gesamten Neuronen des Gesamthirns ausmacht (Trepel, 2015). Durch diese Reichhaltigkeit an Neuronen war zu vermuten, dass auch das Kleinhirn im Rahmen der ALS beteiligt sein könnte. Mit dieser Arbeit sollte resultierend untersucht werden, welche Wirkung der Neurotransmitter PACAP im Rahmen des SOD1 (G93A)-Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose auf das Kleinhirn makro- sowie mikroskopisch hat.

## **4.1 Auswirkungen der SOD1-Mutation und des PACAP-Knockouts auf die Purkinjezellen des Kleinhirns**

Die Purkinjezelluntersuchung dieser Arbeit sollte eine mögliche Wirkung einer SOD1-Mutation sowie eines PACAP-Knockouts auf das Kleinhirn untersuchen. Histologisch wurde ein Purkinjezellverlust durch die SOD1-Mutation im Rahmen der ALS bereits durch Afshar et al., 2017 untersucht. Für Auswirkungen von PACAP auf die Purkinjezellen ist derzeit wenig bekannt und auch die Publikationen über ALS-erkrankte Kleinhirne von Allais et al., 2007 und Botia et al., 2007 beschränkten sich auf die Auswirkungen eines PACAP-Knockouts auf einen Granulosazellschichtverlust. Resultierend sollten in dieser Arbeit die Auswirkungen einer SOD1-Mutation und eines PACAP-Knockouts auf die Purkinjezellzahl untersucht werden. Hierzu wurden die Purkinjezellen für die jeweiligen Gruppen gezählt und statistisch ausgewertet.

Weder zum p60/70-Zeitpunkt, noch zum Zeitpunkt Endstadium zeigte die Gruppe WT/WT vs. WT/KO signifikante Unterschiede und so für den alleinigen PACAP-Knockout keine degenerierenden Einflüsse auf die Purkinjezellzahlen. Für die ALS und speziell in menschlichen und Ratten-Motoneuronen ist bereits für PACAP ein vor Apoptose schützender Effekt bekannt (Bonaventura et al., 2018; Morio et al., 1996) und auch für das Kleinhirn war zu erwarten, dass PACAP die Granulosazellen vor Neurotoxizität schützen kann (Botia et al., 2007). Umgekehrt hat eine PACAP-Defizienz einen zellschädigenden Einfluss auf die Neurogenese im unreifen Kleinhirn, was eine Reduktion der Granulosazellschichtdicke zur Folge hat (Allais et al., 2007). Bei Tieren die eine SOD1-Mutation trugen (SOD1/WT) vs. Wildtyp (WT/WT) zeigte sich zum p60/70-Zeitpunkt in der One-Way-ANOVA kein signifikanter Unterschied in der Purkinjezellzahl. Auch in der Vergleichsgruppe zum Endstadium zeigte sich kein signifikanter Purkinjezellzahlunterschied. Purkinjezellverluste durch ähnliche ALS-assoziierte Gene wie z. B. ATXN2 und C9ORF72 sind bereits nachgewiesen worden (Chew et al., 2015; Tan et al., 2016). Im Speziellen ist für die Auswirkungen der SOD1-Mutation auf Purkinjezellen bekannt, dass eine Herunterregulierung von Calbindin-1 als diskreter Defekt im Kleinhirn auftritt und somit Auswirkungen auf die somatosensorische Reizweiterleitung hat und klinisch einen unsicheren Gang bewirkt (Afshar et al., 2017). Für die Untersuchung der alleinigen SOD1-Mutation kann mit dieser Arbeit ein möglicher zellschädigender Einfluss auf die Purkinjezellen nicht bestätigt werden.

Zur Differenzierung, ob die beiden untersuchten Faktoren im Zusammenspiel einen signifikanten Einfluss auf die Purkinjezellzahl haben, wurde einerseits die Gruppe WT/KO vs. SOD1/KO verglichen. Hier zeigte sich in der One-Way-ANOVA für p60/70-Tiere mit zusätzlicher SOD1-Mutation, bei vorhandenem PACAP-Knockout ein signifikanter Unterschied von 2,985 Purkinjezellen (KI 0,5145 bis 5,455) und \* ( $p < 0,05$ ). Dies korreliert mit den Erkenntnissen über die Auswirkung der SOD1-Mutation auf das Kleinhirn sowie mit den ALS-assoziierten Genmutation Ataxin 2 und C9ORF72. Selbiger Unterschied konnte für den Endstadium-Zeitpunkt hingegen nicht bestätigt werden. Zu diskutieren ist, ob aufgrund der möglicherweise zu geringen Stichprobe eine One-Way-ANOVA für diesen Einzelgruppenvergleich ausreicht. Ein durchgeführter t-Test der Gruppe WT/KO Endstadium vs. SOD1/KO Endstadium zeigte mit einer Differenz von 0.0055 und \*\* ( $p < 0,01$ ) einen signifikanten Unterschied.

Für PACAP zeigte der Mittelwertsunterschied in der One-Way-ANOVA im Vergleich SOD1/WT vs. SOD1/KO zu beiden Messzeitpunkten keinen zusätzlichen, schädigenden Einfluss vom PACAP-Knockout auf die Purkinjezellzahl bei bestehender SOD1-Mutation als Vorschädigung des Kleinhirns. Zu vermuten ist, dass an Tag p60/70 die Neurogenese des Kleinhirns im Mausleben noch nicht als abgeschlossen zu bewerten ist. Eine alleinige SOD1-Mutation oder ein alleiniger PACAP-Knockout könnte daher möglicherweise noch durch eine vermehrte physiologische Neurogenese des Kleinhirns kompensiert werden und so noch keine ALS-typischen Degenerationen nachweisbar sein. Diese vermutete Gegenregulation durch das Kleinhirn ist, im Hinblick auf die Literatur, bereits beim Menschen als kompensatorische Hypertrophie der grauen Substanz des Kleinhirns als Folge der Atrophie des Grauen-Substanz-Volumens im präzentralen Gyrus des Großhirns beschrieben (Qiu et al., 2019). Im Zusammenspiel beider Faktoren zeigte sich jedoch bereits im Frühstadium der ALS, aber nicht zum Endstadium-Zeitpunkt, dass eine SOD1-Mutation bei bereits vorliegender PACAP-Defizienz zu signifikanten Purkinjezellverlusten führte. Diese Ergebnisse korrelierten zum einen mit den Ergebnissen von Afshar et al., 2017 für SOD1-Auswirkungen auf Purkinjezellen, aber auch mit den Ergebnissen von Ringer, et al. 2013, wo ein gleichzeitiger PACAP-Knockout bei bestehender SOD1-Mutation zu Untergang parasymphatischer und sympathischer Neurone führte. Im Endstadium der Erkrankung führte dieses Zusammenspiel nicht zu einer weiteren Progredienz der Zelldegeneration, sodass man für SOD1 vor allem schädigende Einflüsse im Frühstadium annehmen kann. Für den zusätzlichen PACAP-Knockout bei bestehender SOD1-Mutation (SOD1/WT vs.



SOD1/KO) war hingegen kein signifikant stärkerer Abfall in der Purkinjezellzahl nachzuweisen und deutet nicht auf einen starken Einfluss von PACAP auf Purkinjezellen bei SOD1-Vorschädigung hin.

Zusammenfassend konnte in diesem histologischen Experiment der Arbeit eine signifikante Auswirkung auf den Verlauf der ALS nicht alleinig für SOD1-Mutation und PACAP-Knockout zu beiden Messzeitpunkten bestätigt werden. Die mögliche neuroprotektive Wirkung vom Monofaktor PACAP oder der schädigenden Wirkung der SOD1-Mutation, wie in dieser Arbeit als Hypothese aufgestellt, konnte nur im Zusammenspiel beider Faktoren bestätigt werden. Dieses Zusammenspiel und ein krankheitsmodifizierender Verlauf sind beschränkt auf die Effekte der zusätzlichen SOD1-Mutation, jedoch nicht für den zusätzlichen PACAP-Knockout bei Vorliegen des anderen Faktors. Die ALS gilt jedoch als multisystemische Netzwerkerkrankung mit charakteristischer gestörter Konnektivität (Dukic et al., 2019) und eine Verschlechterung des Krankheitsverlaufes ist resultierend möglicherweise nicht alleinig auf einen Monofaktor wie PACAP und SOD1 zurückzuführen. Ein weiteres ungeklärtes Ergebnis ist, dass alle berechneten Werte zum p60/70-Zeitpunkt kleiner ausfallen im Vergleich zum Endstadium-Zeitpunkt. Hier könnte vermutet werden, dass die Entwicklung des Kleinhirns zum Zeitpunkt p60/70 noch nicht abgeschlossen ist und die natürliche Neurogenese auch die Purkinjezellzahl generell mit ansteigen lässt. Dieses Ergebnis kann jedoch nicht mithilfe dieser Thesis beantwortet werden und jegliche Vermutungen diesbezüglich wären zu spekulativ, da auch die vorhandene Literatur dazu keine Aussage macht.

Die Limitationen dieser Arbeit waren zum einen die kleine Anzahl an Gewebeproben für die jeweiligen Gruppen, da keine Tiere neu gezüchtet wurden. Eine Vergrößerung der Probenanzahl könnte demnach zu anderen Ergebnissen führen. Des Weiteren ähnelt das Kleinhirn der Maus zwar im Aufbau dem des Menschen, ist jedoch im makroskopischen Größenvergleich nicht gleichzusetzen. Diese Arbeit untersuchte die Auswirkungen auf das gesamte Kleinhirn in der histologischen Schnittführung, differenzierte jedoch nicht in einzelne Regionen. Eine genauere Untersuchung der relevanten Kleinhirnregionen wie z. B. der Vermis und der Kleinhirnhemisphären, aber auch der Granulosazellschicht (neben der Purkinjezellschicht liegend) und der Kleinhirnkerne könnten in zukünftigen Studien eine spezifischere Aussage über die Auswirkungen von SOD1 und PACAP auf funktionell unterschiedliche Teile des Kleinhirns treffen. Auch die Einbindung von

PACAP in z. B. peripherer Nervenregeneration (Armstrong et al., 2003) zeigt, dass eine neuroregenerative Wirkung von PACAP im Rahmen der ALS nicht ausgeschlossen werden kann, sofern ein zusätzlicher pathologischer Stimulus vorliegt. Somit kann diese mögliche neuroprotektive Wirkung Ziel zukünftiger medikamentöser und immunologischer Therapieansätze sein.

## **4.2 Auswirkungen von PACAP und SOD1-Mutation auf den makroskopischen Querdurchmesser und die Länge des Kleinhirns**

Im Rahmen der Multinetzwerkerkrankung wie der ALS zeigte sich, im Hinblick auf die Literatur, dass auch das Kleinhirn im Krankheitsverlauf beteiligt ist (Saber et al., 2016). Wie bereits in der Purkinjenzelluntersuchung ist auch in diesem Abschnitt eine mögliche Wirkung einer SOD1-Mutation sowie eines PACAP-Knockouts, als molekulare Ursache, zentraler Fokus. Histologisch wurde ein Purkinjenzellverlust durch Afshar et al., 2017 beschrieben und auch die Untersuchungen von Allais et al., 2007 und Botia et al., 2007 bestätigten eine Kleinhirnbeteiligung mit Granulosazellschichtverlust für die PACAP-Defizienz. Bei drastisch vermehrten Zellreduktionen sind als theoretische Grundlage auch resultierende makroskopische Atrophien des Kleinhirns zu vermuten. Diese mögliche Atrophie des Kleinhirns sollte in diesem Abschnitt der Arbeit durch die MRT-Diagnostik bei PACAP-defizienten und SOD1-Mäusen untersucht werden. Die MRT-Diagnostik hat sich bereits in Tierversuchen für andere neurologische Erkrankungen wie der Niemann-Pick Typ C Erkrankung (Totenhagen et al., 2017), aber auch für die Diagnostik der ALS (Tu et al., 2019) etabliert. Makroskopische Unterschiede wurden in diesem Abschnitt der Arbeit durch einen berechneten Querdurchmesser und die Länge des Kleinhirns für die untersuchten Mausgruppen analysiert.

Im Vergleich der Gruppen WT/WT vs. WT/KO zum p60/70 Zeitpunkt zeigte sich für den alleinigen PACAP-Knockout kein signifikanter Mittelwertsunterschied im Querdurchmesser des Kleinhirns. Im Vergleich der Gruppe WT/WT p60/70 vs. SOD1/WT p60/70, welche alleinig die SOD1-Mutation besaß, zeigte sich in der One-Way-ANOVA ein signifikanter Größenunterschied im Querdurchmesser. Im Hinblick auf die Literatur, könnten Purkinjenzellen (Afshar et al., 2017) untergegangen sein und so makroskopisch eine Kleinhirnatrophie im Querdurchmesser bewirkt haben. Dies ist jedoch nicht alleinig mit der geringen Größe der Purkinjenzellschicht zu begründen, sodass

hier auch ein möglicher Untergang von z. B. Fasern im Kleinhirnmantel zu vermuten ist. Für PACAP ist dieser Effekt im Querdurchmesser nicht ersichtbar und ein möglicher Granulosazellverlust durch den PACAP-Knockout (Allais et al., 2007; Botia et al., 2007) nicht zu bestätigen. Zwischen den Gruppen SOD1/WT p60/70 vs. SOD1/WT Endstadium war kein signifikanter Unterschied für die beiden Messzeitpunkte nachweisbar gewesen und so im Vergleich des Frühstadiums zum Endstadium war durch die SOD1-Mutation keine progrediente Atrophie im Verlauf der ALS nachweisbar. Die durchschnittliche Länge des Kleinhirns war im Vergleich der gleichaltrigen Gruppe WT/WT p60/70 vs. WT/KO p60/70 signifikant unterschiedlich. PACAP könnte, im Hinblick auf die Literatur, im Frühstadium der ALS Einfluss auf die Granulosazellschicht (Allais et al., 2007; Botia et al., 2007) und resultierend auf die makroskopische Größe (hier der Länge) des Kleinhirns gehabt haben. Ein zellulärer Mechanismus ist bisher ungeklärt und Vermutungen wären rein spekulativ. Für den Vergleich der Gruppe WT/WT p60/70 vs. SOD1/WT p60/70 konnte kein signifikanter Mittelwertsunterschied für die alleinige SOD1-Mutation in der Länge des Kleinhirns bestätigt werden und konnte somit die Ergebnisse im Querdurchmesser nicht bestätigen. Wie auch im Querdurchmesser berechnet, zeigte der Vergleich der Gruppen im Frühstadium mit der Gruppe im Endstadium SOD1/WT p60/70 vs. SOD1/WT Endstadium keinen signifikanten Mittelwertsunterschied und somit keine signifikante Progredienz der Atrophie für die SOD1-Mutation in der Länge des Kleinhirns. Ein Größenabfall im Querdurchmesser und der Länge könnte anatomisch-morphologisch auf eine Atrophie des Spino- sowie des Pontocerebellum deuten. Diese sind, wie unter Kapitel 1.4 beschrieben, maßgeblich an der Halte- und Stützmotorik des Organismus beteiligt und ein Ausfall kann zu ALS-typischen cerebellären Störungen, wie z. B. Dysmetrien und Rumpf- und Stammaataxien führen. Die deutliche Neuronendichte mit 50 Milliarden Neuronen des Kleinhirns (Trepel, 2015), betroffen von Zelluntergang und Atrophie, bestärkt daher die Theorie, dass bereits im frühen Verlauf die oben angegebenen Symptome von Kleinhirnerkrankungen (Ulfig, 2008) bei der Amyotrophen Lateralsklerose auftreten und somit magnetresonanztomographische Analysen des Kleinhirns zur Frühdiagnostik im SOD1-Mausmodell eingesetzt werden könnten.

Eine neurologische Untersuchung der Mäuse bezüglich der Kleinhirnausfälle vor Entnahme des Hirngewebes wurde nicht getätigt und kann damit nicht bestätigt werden. Zudem konnte in dieser Arbeit keine Aussage für die gleichzeitige Mutation beider

untersuchter Mutationen und Knockouts (SOD1/PACAP-Knockout) getroffen werden, da diese Gewebe nicht zur Verfügung standen und keine neuen Tiere für diese Arbeit gezüchtet wurden. Weitere Limitationen dieser Arbeit waren die kleine Stichprobengröße der untersuchten Mäuse und die hier nicht durchgeführte Differenzierung, welche Kleinhirnzellen im Querdurchmesser und der Länge durch die SOD1-Mutation oder den PACAP-Knockout möglicherweise untergingen. Hier kommen neben den Purkinjezellen, den Granulosazellen auch Mikroglia in Betracht (Afshar et al., 2017; Allais et al., 2007; Botia et al., 2007). In Bezug auf die zugrundeliegende Arbeit von Ringer et al. konnte bereits eine Beteiligung von SOD1, aber nicht von einem PACAP-Knockout, mit einer Aktivierung der Mikroglia im Rahmen der ALS in Verbindung gebracht werden.

### **4.3 Nutzbarkeit des Flächenvergleichs der histologischen- und MRT-Diagnostik im SOD1 (G93A)-Mausmodell**

Gewebeproben des Kleinhirns können histologisch nicht in vivo entnommen werden und sind daher nur im Tiermodell oder an verstorbenen menschlichen Patienten durchführbar. Die radiologische Diagnostik durch MRT bietet einerseits den Vorteil der Etablierung der in vivo Beurteilung von neurologischen Erkrankungen wie z. B. der Niemann-Pick Erkrankung, ist aber auch bereits für die Beurteilung von ALS-erkrankten cerebellären Tracti untersucht (Totenhagen et al., 2017; Tu et al., 2019). Mit dieser Arbeit wurde daher verglichen, in wie weit makroskopische Veränderungen, hier eine Atrophie in der Flächenberechnung des Kleinhirns, gleichwertig durch Histologie und Radiologie für den PACAP-Knockout im SOD1-Mausmodell beurteilt werden können. Dadurch sollte zudem eine Aussage über die mögliche Nutzbarkeit der MRT im Verlauf der ALS-Erkrankung getroffen werden.

In der histologischen Flächenberechnung zeigte sich in der One-Way-ANOVA der Gruppen WT/WT p60/70 vs. WT/KO p60/70 ein signifikanter Mittelwertsunterschied für den alleinigen PACAP-Knockout und könnte, im Hinblick auf die Literatur, auf eine Zelldegeneration z. B. der Granulosazellen mit resultierender Kleinhirnatrophie hindeuten (Allais et al., 2007; Botia et al., 2007). Ein signifikanter Unterschied in den histologischen Flächen WT/WT vs. SOD1/WT war für den p60/70 Zeitpunkt nicht nachzuweisen. Der Vergleich von SOD1/WT vs. SOD1/KO zum p60/70- als auch zum Endstadium-Zeiptunkt zeigte keine signifikante zusätzliche Einwirkung vom PACAP-

Knockout bei SOD1-Mutation als zusätzlicher Faktor auf die histologisch nachweisbare Fläche. Der zu erwartende Effekt einer PACAP-Defizienz auf z. B. die Granulosazellschicht mit resultierender Atrophie war nicht im Zusammenspiel beider Faktoren zu beobachten. Im Vergleich von SOD1/WT p60/70 vs. SOD1/WT End zeigte sich für den Vergleich von Frühstadium- mit Endstadium SOD1-Tieren kein signifikanter Flächenunterschied zwischen den Messzeitpunkten.

In der MRT-Flächenberechnung zeigte sowohl WT/WT p60/70 vs. WT/KO p60/70 in der One-Way-ANOVA einen signifikanten Unterschied für den alleinigen PACAP-Knockout, als auch WT/WT p60/70 vs. SOD1/WT p60/70 einen signifikanten Unterschied für die alleinige SOD1-Mutation. Ein monofaktorieller Unterschied durch entweder die alleinige SOD1-Mutation oder den PACAP-Knockout konnte so im MRT nachgewiesen werden und unterstützt die Vermutung von Auswirkungen einer PACAP-Defizienz und einer SOD1-Mutation auf die Kleinhirnmakroskopie. Ob vermehrt Granulosazellen (Allais et al., 2007; Botia et al., 2007) oder Purkinjezellen (Afshar et al., 2017) untergingen, oder ein zusätzlicher Untergang von Nervenfasern der Zellschichten stattfand und die Atrophie auslösten, konnte in dieser Arbeit nicht differenziert bestätigt werden. Der Vergleich SOD1/WT p60/70 vs. SOD1/WT Endstadium sollte einen möglichen Verlauf der atrophischen Effekte von SOD1 im Verlauf der ALS-Erkrankung darstellen. Diese Progredienz war jedoch in der MRT-Flächenberechnung nicht signifikant nachweisbar. Daher ist hier kein weiteres Fortschreiten der Atrophie des Kleinhirns durch SOD1 im Verlauf der Erkrankung zu vermuten.

Zusammenfassend zeigte die Flächenberechnung eine möglicherweise neuroprotektive Wirkung von PACAP auf die Größe des Kleinhirns. In beiden Flächenberechnungsmethoden der unterschiedlichen Schnittverfahren zeigte eine PACAP-Defizienz einen signifikanten Größenunterschied in der Fläche und bestärkt die Auswirkungen des Knockouts auf das Kleinhirn von Botia et al., 2007 und Allais et al., 2007. Dieses Resultat war für die alleinige SOD1-Mutation (WT/WT p60/70 vs. SOD1/WT p60/70) nicht in der histologischen Analyse, sondern nur in der MRT-Berechnung zu bestätigen. In beiden Diagnostikverfahren sind Auswirkungen der zwei Faktoren jedoch nur im Frühstadium (p60/70) und nicht im Endstadium (p120) der ALS nachzuweisen, sodass eine Nutzbarkeit der Flächenberechnung nur zum p60/70 Zeitpunkt gegeben scheint. Ob bei der Kleinhirnatrophie in der Fläche vermehrt Purkinjezellen (Afshar et al., 2017) oder andere Zellen wie zum Beispiel Granulosazellen (Allais et al.,

2007; Botia et al., 2007) untergingen, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden und sollte in zukünftigen Untersuchungen differenziert betrachtet werden. Weiterhin konnten Aussagen über die Gruppen mit gleichzeitiger SOD1- und PACAP-Mutation (SOD1/KO) aufgrund der fehlenden Gewebeprobe zu beiden Messzeitpunkten nicht getätigt werden, sodass insgesamt nur eine geringe Anzahl von Tieren in diese Arbeit eingebunden werden konnte. Eine weitere Schlussfolgerung dieses Teils der Arbeit sollte eine Aussage über die Nutzbarkeit der Flächenberechnung, mithilfe des histologischen Schnittes und der MRT-Diagnostik, für eine Erkennung der Auswirkungen einer SOD1- sowie einer PACAP-Mutation auf das Kleinhirn sein. Die histologische Analyse ist vor allem in Tiermodellen ein oft genutztes Verfahren, die MRT besitzt in der klinischen Forschung der ALS des Menschen eine wichtige Rolle. Beide Diagnostikverfahren bewiesen atrophische Wirkungen einer PACAP-Defizienz auf das Kleinhirn, jedoch wies die nichtinvasive MRT-Diagnostik Auswirkungen beider Faktoren sicher nach und könnte somit als sinnvolle Diagnostikmethode in der ALS-Kleinhirnforschung verwendet werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine neurodegenerative Erkrankung. Hauptsymptom ist ein Verlust der Willkürmotorik, bedingt durch ein kontinuierliches Absterben motorischer Nervenzellen in Cortex, Hirnstamm und Rückenmark. Aktuell wird davon ausgegangen, dass sich die Pathologie der ALS nicht nur auf Motoneurone beschränkt, sondern es sich um eine multisystemische Netzwerkerkrankung mit charakteristischer, gestörter Konnektivität handelt. Basierend auf einer genetischen Mutation, die in 20% aller vererbaren ALS Fälle auftritt, hat die Etablierung des Superoxiddismutase 1 (SOD1) - transgenen Mausmodells im Jahr 1994 durch Gurney et al. wesentlich zur Aufklärung möglicher zugrunde liegender Pathomechanismen beigetragen. Das Neuropeptid Pituitary-adenylate-cyclase-activating-polypeptide (deutsch: Hypophysen-Adenylatcyclase-aktivierendes-Protein; PACAP) wurde initial aus dem Hypothalamus isoliert und gehört zu einer Genfamilie, der auch das Vasoaktive Intestinale Polypeptid (VIP), Secretin, das Wachstumshormon (GH) sowie Glucagon angehören. PACAP besitzt verschiedene neuroprotektive, aber auch neuroinflammatorische Funktionen und Auswirkungen auf das ZNS und ist in akuten und chronischen neurodegenerativen Erkrankungen wie der ALS eingebunden. Diese Arbeit beschäftigte sich mit den Auswirkungen einer PACAP-Defizienz im SOD1 (G93A)-Mausmodell der ALS mit Fokus auf mikro- sowie makroskopische Veränderungen im Kleinhirn. Hierzu besaßen die untersuchten Mausgruppen die genetische SOD1-Mutation, einen PACAP-Knockout oder beide Faktoren und es wurden Auswirkungen zu den zwei Messzeitpunkten des präsymptomatischen Stadiums (p60/70) und Endstadium (p120) ausgewertet. Histologisch wurden für die eingebundenen Kleinhirngewebeproben die Purkinjellen gezählt sowie eine mögliche makroskopische Atrophie des Kleinhirns (anhand Querdurchmesser und Länge) im MRT beurteilt. Abschließend wurde ein Vergleich zwischen der histologischen Schnittführung durch das Mikrotom und der MRT-Diagnostik anhand einer Flächenberechnung im Sagittalschnitt unternommen.

In der Purkinjellanalyse führte eine monofaktorielle SOD1-Mutation oder der alleinige PACAP-Knockout zu beiden Messzeitpunkten zu keinem Purkinjelluntergang im Vergleich zum Wildtyp. Das Vorhandensein der SOD1-Mutation bei bestehendem PACAP-Knockout (WT/KO vs. SOD1/KO) im Frühstadium führte zu einer verringerten Purkinjellzahl. Beim Vergleich der Gruppen SOD1/WT vs. SOD1/KO trat dieser Effekt weder im Früh- und Endstadium auf.

Der im MRT berechnete Querdurchmesser des Kleinhirns zeigte für die reine SOD1-Mutation (WT/WT vs. SOD1/WT) zum p60/70- und Endstadium-Zeitpunkt eine signifikante makroskopische Atrophie. Für den alleinigen PACAP-Knockout war dies im Querdurchmesser nicht zu beobachten. In der berechneten Länge des Kleinhirns zeigte sich hingegen nur die Gruppe des alleinigen PACAP-Knockouts (WT/WT p60/70 vs. WT/KO p60/70) als signifikant atroph. Diese Atrophie konnte in der Kleinhirnlänge nicht für die SOD1-Mutation zum p60/70- oder Endstadium-Zeitpunkt (WT/WT p60/70 vs. SOD1/WT p60/70 oder SOD1/WT p60/70 vs. SOD1/WT Endstadium) repliziert werden. Diese MRT-Ergebnisse deuteten auf einen möglichen Gewebeuntergang bei Defizienz bzw. neuroprotektive Wirkung bei normaler Funktion, möglicherweise auch auf die Zellgenese sowie den Zelluntergang des Kleinhirns, hin. Diese Diagnostikmethode könnte zudem, übertragen auf den Menschen, in der ALS-Kleinhirndiagnostik in vivo sinnvoll sein und für zukünftige Studien forciert genutzt werden. Im letzten Schritt dieser Arbeit wurde verglichen, inwieweit eine makroskopische Atrophie durch Flächenberechnung des SOD1-mutierten sowie PACAP-defizienten Kleinhirns gleichwertig durch Histologie und Radiologie beurteilt werden kann. Histologisch konnte die Nutzbarkeit einer Flächenberechnung für die ALS ausschließlich im präsymptomatischen ALS-Verlauf (p60/70-Zeitpunkt) bewiesen werden. Alleinig PACAP-Knockout Mäuse im ALS-Frühstadium (WT/KO p60/70) zeigten signifikant atrophe Kleinhirne in der Fläche. In der PACAP-Knockout-Endstadium-Gruppe, aber auch für den Monofaktor der SOD1-Mutation konnte zu beiden Messzeitpunkten diese Signifikanz nicht bestätigt werden. In der MRT-Flächenberechnung war zum p60/70-Zeitpunkt sowohl für die alleinig PACAP-Knockout-, als auch die SOD1-mutierten Tiere eine signifikante Atrophie des Kleinhirns nachweisbar. Alleinig der Unterschied von SOD1/WT p60/70 vs. SOD1/WT Endstadium zeigte keine Progredienz in der Flächenatrophie. Zusammenfassend erscheint mit beiden Diagnostikmethoden im Frühstadium der ALS eine Analyse der Kleinhirnfläche sinnvoll. Im Unterschied zu der histologischen Schnittführung war jedoch im MRT auch eine Wirkung durch die SOD1-Mutation eindeutig nachzuweisen. Zudem liegt der unumstrittene Vorteil der MRT bei der Möglichkeit der in vivo Diagnostik, welche auch für den Menschen anwendbar ist. Somit scheint im Vergleich zum bewährten histologischen Schnitt, die Nutzung der radiologischen Bewertung des Kleinhirns im SOD1-Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose sinnvoll und könnte zukünftig eine größere Rolle in der Forschungsdiagnostik spielen.



## 6 Summary

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease. The main symptom is a loss of voluntary motor skills, caused by the continuous death of motor nerve cells in the cortex, brain stem and spinal cord. It is assumed that the pathology of ALS is not only limited to motor neurons, but is a multisystem network disease with characteristic impaired connectivity. Based on a genetic mutation that occurs in 20% of all hereditary ALS cases, the establishment of the superoxide dismutase 1 (SOD1) transgenic mouse model by Gurney et al. in 1994 contributed significantly to the elucidation of possible underlying pathomechanisms. The neuropeptide Pituitary-adenylate-cyclase-activating-polypeptide (PACAP) was initially isolated from the hypothalamus and belongs to a gene family that also includes the vasoactive intestinal polypeptide (VIP), secretin, the growth hormone (GH), as well as glucagon. PACAP has various neuroprotective, but also neuroinflammatory functions and effects on the CNS and is involved in acute and chronic neurodegenerative diseases such as ALS. This dissertation thesis dealt with the effects of a PACAP deficiency in the SOD1 (G93A) mouse model of ALS with a focus on microscopic and macroscopic changes of the cerebellum. For this purpose, the examined mouse groups either harbored the genetic SOD1 mutation, or a PACAP knockout, or both factors, and effects at the two measurement times of the presymptomatic stage (p60/70) and end stage (p120) were evaluated. Histologically, the Purkinje cells were counted and a possible macroscopic atrophy of the cerebellum (based on the transverse diameter and length) assessed with MRI. Finally, histological microtome sections were compared with the MRT diagnosis based on an area calculation in the sagittal plane.

In the Purkinje cell analysis, neither a monofactorial SOD1 mutation, nor the sole PACAP knockout resulted in Purkinje cell death at either point in time. A simultaneous occurrence of the SOD1 mutation with an existing PACAP knockout (WT/KO vs. SOD1/KO) in the early stage led to a reduced Purkinje cell count. For the group SOD1/WT vs. SOD1/KO, this effect could not be proven, both in the early stage and endstage.

The transverse diameter of the cerebellum calculated in the MRI showed significant macroscopic atrophy for the pure SOD1 mutation (WT / WT vs. SOD1 / WT) at the p60/70 and endstage time. For the sole PACAP knockout, this effect was not observed. In the calculated length of the cerebellum, however, only the group with the sole PACAP knockout (WT/WT p60/70 vs. WT/KO p60/70) was found to be significantly atrophic.

This atrophy could not be replicated in the cerebellar length for the SOD1 mutation at p60/70 or endstage (WT/WT p60/70 vs. SOD1/WT p60/70 or SOD1/WT p60/70 vs. SOD1/WT endstage). These MRI results indicated a possible tissue destruction in the case of deficiency or a neuroprotective effect in the case of normal function, possibly also to the cell genesis and cell death of the cerebellum. Translated into humans, this diagnostic method could also be useful in ALS cerebellar diagnostics in vivo and may be used more forcefully in future studies.

In the last step of this thesis it was compared to what extent a macroscopic atrophy can be assessed equally by histology and radiology by calculating the area of the SOD1-mutated and PACAP-deficient cerebellum. Histologically, the usability of an area calculation could only be proven in the presymptomatic ALS mice (p60/70 time point). Here, PACAP knockout mice showed significant cerebellar atrophy. In the PACAP knockout end-stage group, but also for the monofactor of the SOD1 mutation, however, this significance could not be confirmed at either time point. In the MRT area calculation, a significant atrophy of the cerebellum was detectable for both the PACAP knockout and SOD1 mutated animals at the p60/70 time point. Only the comparison between SOD1/WT p60/70 vs. SOD1/WT End showed no progression in surface atrophy. In summary, with both diagnostic methods, histology and MRI, there is the possibility of a meaningful analysis of the cerebellar surface in the early stages of ALS. In contrast to histology, an effect of the SOD1 mutation could also be clearly demonstrated with MRI. In addition, the undisputed advantage of MRI lies in the possibility of in vivo diagnostics, which can also be used for humans. Thus, in comparison to histological sectioning, the use of a radiological evaluation of the cerebellum in the SOD1 mouse model of ALS seems beneficial and could play a greater role in future research.

## 7 Literaturverzeichnis

- Afshar, P., Ashtari, N., Jiao, X., Rahimi-Balaei, M., Zhang, X., Yaganeh, B., . . . Marzban, H. (2017). Overexpression of Human SOD1 Leads to Discrete Defects in the Cerebellar Architecture in the Mouse. *Front Neuroanat*, *11*, 22. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00022>
- Allais, A., Burel, D., Isaac, E. R., Gray, S. L., Basille, M., Ravni, A., . . . Gonzalez, B. J. (2007). Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Eur J Neurosci*, *25*(9), 2604-2618. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05535.x>
- Alsultan, A. A., Waller, R., Heath, P. R., & Kirby, J. (2016). The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. *Degener Neurol Neuromuscul Dis*, *6*, 49-64. <https://doi.org/10.2147/DNND.S84956>
- Apolloni, S., Amadio, S., Fabbrizio, P., Morello, G., Spampinato, A. G., Latagliata, E. C., . . . Volonté, C. (2019). Histaminergic transmission slows progression of amyotrophic lateral sclerosis. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, *10*(4), 872-893. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12422>
- Apolloni, S., Fabbrizio, P., Amadio, S., Napoli, G., Verdile, V., Morello, G., . . . Volonté, C. (2017). Histamine Regulates the Inflammatory Profile of SOD1-G93A Microglia and the Histaminergic System Is Dysregulated in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Immunol*, *8*, 1689. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01689>
- Armstrong, B. D., Hu, Z., Abad, C., Yamamoto, M., Rodriguez, W. I., Cheng, J., . . . Waschek, J. A. (2003). Lymphocyte regulation of neuropeptide gene expression after neuronal injury. *J Neurosci Res*, *74*(2), 240-247. <https://doi.org/10.1002/jnr.10750>
- Atkin, J. D., Farg, M. A., Walker, A. K., McLean, C., Tomas, D., & Horne, M. K. (2008). Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, *30*(3), 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.02.009>
- Bakavayev, S., Chetrit, N., Zvagelsky, T., Mansour, R., Vyazmensky, M., Barak, Z., . . . Engel, S. (2019). Cu/Zn-superoxide dismutase and wild-type like fALS SOD1 mutants produce cytotoxic quantities of H. *Sci Rep*, *9*(1), 10826. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47326-x>
- Bannwarth, S., Ait-El-Mkadem, S., Chaussonot, A., Genin, E. C., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., . . . Paquis-Flucklinger, V. (2014). A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain*, *137*(Pt 8), 2329-2345. <https://doi.org/10.1093/brain/awu138>
- Basso, M., Pozzi, S., Tortarolo, M., Fiordaliso, F., Bisighini, C., Pasetto, L., . . . Bonetto, V. (2013). Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic

- lateral sclerosis. *J Biol Chem*, 288(22), 15699-15711.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.425066>
- Bede, P., Chipika, R. H., Christidi, F., Hengeveld, J. C., Karavasilis, E., Argyropoulos, G. D., . . . Hardiman, O. (2021). Genotype-associated cerebellar profiles in ALS: focal cerebellar pathology and cerebro-cerebellar connectivity alterations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2021-326854>
- Bensimon, G., Lacomblez, L., & Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med*, 330(9), 585-591. <https://doi.org/10.1056/NEJM199403033300901>
- Bhandari, R., & Kuhad, A. (2018). Edaravone: a new hope for deadly amyotrophic lateral sclerosis. *Drugs Today (Barc)*, 54(6), 349-360.  
<https://doi.org/10.1358/dot.2018.54.6.2828189>
- Boillée, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kassiotis, G., . . . Cleveland, D. W. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*, 312(5778), 1389-1392.  
<https://doi.org/10.1126/science.1123511>
- Bonaventura, G., Iemmolo, R., D'Amico, A. G., La Cognata, V., Costanzo, E., Zappia, M., . . . Cavallaro, S. (2018). PACAP and PAC1R are differentially expressed in motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients and support survival of iPSC-derived motor neurons. *J Cell Physiol*, 233(4), 3343-3351.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.26182>
- Botia, B., Basille, M., Allais, A., Raoult, E., Falluel-Morel, A., Galas, L., . . . Vaudry, D. (2007). Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides*, 28(9), 1746-1752. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.04.013>
- Brenner, D., & Weishaupt, J. H. (2019). Update on amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Curr Opin Neurol*. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000737>
- Brown, R. H., & Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*, 377(2), 162-172. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1603471>
- Brownell, G. L., Budinger, T. F., Lauterbur, P. C., & McGeer, P. L. (1982). Positron tomography and nuclear magnetic resonance imaging. *Science*, 215(4533), 619-626. <https://doi.org/10.1126/science.215.4533.619>
- Budinger, T. F., & Lauterbur, P. C. (1984). Nuclear magnetic resonance technology for medical studies. *Science*, 226(4672), 288-298.  
<https://doi.org/10.1126/science.6385252>
- Charcot, J.-M., & Joffroy, A. (1869). *Deux cas d'atrophie musculaire progressive: Avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière.*
- Chen, Y. Z., Bennett, C. L., Huynh, H. M., Blair, I. P., Puls, I., Irobi, J., . . . Chance, P. F. (2004). DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic

- lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet*, 74(6), 1128-1135.  
<https://doi.org/10.1086/421054>
- Chew, J., Gendron, T. F., Prudencio, M., Sasaguri, H., Zhang, Y. J., Castanedes-Casey, M., . . . Petrucelli, L. (2015). Neurodegeneration. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. *Science*, 348(6239), 1151-1154. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9344>
- Chou, C. C., Zhang, Y., Umoh, M. E., Vaughan, S. W., Lorenzini, I., Liu, F., . . . Rossoll, W. (2018). TDP-43 pathology disrupts nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic transport in ALS/FTD. *Nat Neurosci*, 21(2), 228-239. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0047-3>
- Cirulli, E. T., Lasseigne, B. N., Petrovski, S., Sapp, P. C., Dion, P. A., Leblond, C. S., . . . Consortium, F. S. (2015). Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science*, 347(6229), 1436-1441. <https://doi.org/10.1126/science.aaa3650>
- Consonni, M., Dalla Bella, E., Nigri, A., Pinardi, C., Demichelis, G., Porcu, L., . . . Ferraro, S. (2019). Cognitive Syndromes and C9orf72 Mutation Are Not Related to Cerebellar Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurosci*, 13, 440. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00440>
- Cudkowicz, M. E., Titus, S., Kearney, M., Yu, H., Sherman, A., Schoenfeld, D., . . . Shefner, J. M. (2014). Safety and efficacy of ceftriaxone for amyotrophic lateral sclerosis: a multi-stage, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 13(11), 1083-1091. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(14\)70222-4](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(14)70222-4)
- D'Amico, A. G., Maugeri, G., Saccone, S., Federico, C., Cavallaro, S., Reglodi, D., & D'Agata, V. (2020). PACAP Modulates the Autophagy Process in an In Vitro Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int J Mol Sci*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082943>
- Damiano, M., Starkov, A. A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., . . . Manfredi, G. (2006). Neural mitochondrial Ca<sup>2+</sup> capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem*, 96(5), 1349-1361. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03619.x>
- De Giorgio, F., Maduro, C., Fisher, E. M. C., & Acevedo-Arozena, A. (2019). Transgenic and physiological mouse models give insights into different aspects of amyotrophic lateral sclerosis. *Dis Model Mech*, 12(1). <https://doi.org/10.1242/dmm.037424>
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., . . . Rademakers, R. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), 245-256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011>

- Delgado, M., & Ganea, D. (1999). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit interleukin-12 transcription by regulating nuclear factor kappaB and Ets activation. *J Biol Chem*, *274*(45), 31930-31940. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.31930>
- Deng, H. X., Chen, W., Hong, S. T., Boycott, K. M., Gorrie, G. H., Siddique, N., . . . Siddique, T. (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*, *477*(7363), 211-215. <https://doi.org/10.1038/nature10353>
- Dickson, L., & Finlayson, K. (2009). VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther*, *121*(3), 294-316. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.11.006>
- Dukic, S., McMackin, R., Buxo, T., Fasano, A., Chipika, R., Pinto-Grau, M., . . . Nasseroleslami, B. (2019). Patterned functional network disruption in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Brain Mapp*. <https://doi.org/10.1002/hbm.24740>
- Fahrenkrug, J., & Hannibal, J. (2004). Neurotransmitters co-existing with VIP or PACAP. *Peptides*, *25*(3), 393-401. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.01.010>
- Fecto, F., Yan, J., Vemula, S. P., Liu, E., Yang, Y., Chen, W., . . . Siddique, T. (2011). SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*, *68*(11), 1440-1446. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.250>
- Figueiredo, C. A., Düsedau, H. P., Steffen, J., Gupta, N., Dunay, M. P., Toth, G. K., . . . Dunay, I. R. (2019). Immunomodulatory Effects of the Neuropeptide Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in Acute. *Front Cell Infect Microbiol*, *9*, 154. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00154>
- Freischmidt, A., Wieland, T., Richter, B., Ruf, W., Schaeffer, V., Müller, K., . . . Weishaupt, J. H. (2015). Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat Neurosci*, *18*(5), 631-636. <https://doi.org/10.1038/nn.4000>
- Goldstein, O., Gana-Weisz, M., Nefussy, B., Vainer, B., Nayshool, O., Bar-Shira, A., . . . Orr-Urtreger, A. (2018). High frequency of C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis patients from two founder populations sharing the same risk haplotype. *Neurobiol Aging*, *64*, 160.e161-160.e167. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.12.015>
- Grad, L. I., Yerbury, J. J., Turner, B. J., Guest, W. C., Pokrishevsky, E., O'Neill, M. A., . . . Cashman, N. R. (2014). Intercellular propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(9), 3620-3625. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312245111>
- Guerrero, E. N., Wang, H., Mitra, J., Hegde, P. M., Stowell, S. E., Liachko, N. F., . . . Hegde, M. L. (2016). TDP-43/FUS in motor neuron disease: Complexity and

- challenges. *Prog Neurobiol*, 145-146, 78-97.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.09.004>
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., . . . Deng, H. X. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264(5166), 1772-1775.  
<https://doi.org/10.1126/science.8209258>
- Hannibal, J. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, 453(4), 389-417. <https://doi.org/10.1002/cne.10418>
- Harmar, A. J., Fahrenkrug, J., Gozes, I., Laburthe, M., May, V., Pisegna, J. R., . . . Said, S. I. (2012). Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. *Br J Pharmacol*, 166(1), 4-17. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01871.x>
- Hayashi, Y., Homma, K., & Ichijo, H. (2016). SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1 mutation-negative ALS. *Adv Biol Regul*, 60, 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2015.10.006>
- Hufschmidt, A., Lücking, C. H., Rauer, S., & Glocker, F. X. (2017). Degenerative Erkrankungen der Motoneurone - Amyotrophe Lateralsklerose. In *Neurologie Compact* (Vol. 7. überarbeitete Auflage). Georg Thieme Verlag KG.  
<https://doi.org/10.1055/b-005-143671>
- Ingre, C., Roos, P. M., Piehl, F., Kamel, F., & Fang, F. (2015). Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Epidemiol*, 7, 181-193.  
<https://doi.org/10.2147/CLEP.S37505>
- Johnson, J. O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van Deerlin, V. M., Trojanowski, J. Q., . . . Consortium, I. (2010). Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*, 68(5), 857-864.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.036>
- Johnson, J. O., Piore, E. P., Boehringer, A., Chia, R., Feit, H., Renton, A. E., . . . ITALSGEN. (2014). Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*, 17(5), 664-666. <https://doi.org/10.1038/nn.3688>
- Julien, J. P., & Kriz, J. (2006). Transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*, 1762(11-12), 1013-1024.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.03.006>
- Kaur, S. J., McKeown, S. R., & Rashid, S. (2016). Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene*, 577(2), 109-118.  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.11.049>
- Lelièvre, V., Pineau, N., Du, J., Wen, C. H., Nguyen, T., Janet, T., . . . Waschek, J. A. (1998). Differential effects of peptide histidine isoleucine (PHI) and related peptides on stimulation and suppression of neuroblastoma cell proliferation. A

- novel VIP-independent action of PHI via MAP kinase. *J Biol Chem*, 273(31), 19685-19690. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19685>
- Li, H.-F., & Wu, Z.-Y. (2016). Genotype-phenotype correlations of amyotrophic lateral sclerosis. *Translational Neurodegeneration*, 5(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40035-016-0050-8>
- Liao, C., de Molliens, M. P., Schneebeli, S. T., Brewer, M., Song, G., Chatenet, D., . . . Li, J. (2019). Targeting the PAC1 Receptor for Neurological and Metabolic Disorders. *Curr Top Med Chem*. <https://doi.org/10.2174/1568026619666190709092647>
- Ludolph, A. C. (2015). *Amyotrophe Lateralsklerose (Motoneuronenerkrankungen). Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie Februar*. Retrieved 06.07.2019 from [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/030-0011\\_Amyotrophe\\_Lateralsklerose\\_ALS\\_2015-06.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-0011_Amyotrophe_Lateralsklerose_ALS_2015-06.pdf)
- Luo, L., Song, Z., Li, X., Huiwang, Zeng, Y., Qinwang, . . . He, J. (2019). Efficacy and safety of edaravone in treatment of amyotrophic lateral sclerosis-a systematic review and meta-analysis. *Neurol Sci*, 40(2), 235-241. <https://doi.org/10.1007/s10072-018-3653-2>
- Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., . . . Kawakami, H. (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 465(7295), 223-226. <https://doi.org/10.1038/nature08971>
- Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C. D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M. F., & Manfredi, G. (2002). Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem*, 277(33), 29626-29633. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203065200>
- Mattsson, P., Delfani, K., Janson, A. M., & Svensson, M. (2006). Motor neuronal and glial apoptosis in the adult facial nucleus after intracranial nerve transection. *J Neurosurg*, 104(3), 411-418. <https://doi.org/10.3171/jns.2006.104.3.411>
- Maugeri, G., D'Amico, A. G., Bucolo, C., & D'Agata, V. (2019). Protective effect of PACAP-38 on retinal pigmented epithelium in an in vitro and in vivo model of diabetic retinopathy through EGFR-dependent mechanism. *Peptides*, 119, 170108. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170108>
- Maugeri, G., D'Amico, A. G., Morello, G., Reglodi, D., Cavallaro, S., & D'Agata, V. (2020). Differential Vulnerability of Oculomotor Versus Hypoglossal Nucleus During ALS: Involvement of PACAP. *Front Neurosci*, 14, 805. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00805>
- Miller, R. G., Mitchell, J. D., Lyon, M., & Moore, D. H. (2002). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*(2), CD001447. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001447>
- Miller, R. G., Mitchell, J. D., & Moore, D. H. (2012). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*(3), CD001447. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001447.pub3>



- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R. R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., . . . Coy, D. H. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. In *Biochem Biophys Res Commun* (Vol. 164, pp. 567-574). [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)91757-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)91757-9)
- Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R. D., Kitada, C., Kubo, K., Fujino, M., . . . Arimura, A. (1990). Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun*, *170*(2), 643-648. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)92140-u](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)92140-u)
- Moody, T. W., Lee, L., Iordanskaia, T., Ramos-Alvarez, I., Moreno, P., Boudreau, H. E., . . . Jensen, R. T. (2019). PAC1 regulates receptor tyrosine kinase transactivation in a reactive oxygen species-dependent manner. *Peptides*, *120*, 170017. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.09.005>
- Mora, J. S., Genge, A., Chio, A., Estol, C. J., Chaverri, D., Hernández, M., . . . GROUP, A. S. (2019). Masitinib as an add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomized clinical trial. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 1-10. <https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1632346>
- Morimoto, S., Takahashi, S., Fukushima, K., Saya, H., Suzuki, N., Aoki, M., . . . Nakahara, J. (2019). Ropinirole hydrochloride remedy for amyotrophic lateral sclerosis - Protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, and open-label continuation phase I/IIa clinical trial (ROPALS trial). *Regen Ther*, *11*, 143-166. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.07.002>
- Morio, H., Tatsuno, I., Hirai, A., Tamura, Y., & Saito, Y. (1996). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat-cultured cortical neurons from glutamate-induced cytotoxicity. *Brain Res*, *741*(1-2), 82-88. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)00920-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)00920-1)
- Nagata, T., Ilieva, H., Murakami, T., Shiote, M., Narai, H., Ohta, Y., . . . Abe, K. (2007). Increased ER stress during motor neuron degeneration in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res*, *29*(8), 767-771. <https://doi.org/10.1179/016164107X229803>
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., . . . Lee, V. M. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, *314*(5796), 130-133. <https://doi.org/10.1126/science.1134108>
- Nishimura, A. L., Mitne-Neto, M., Silva, H. C., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., . . . Zatz, M. (2004). A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet*, *75*(5), 822-831. <https://doi.org/10.1086/425287>
- Paracka, L., Kollwe, K., Klietz, M., Petri, S., & Dressler, D. (2019). IncobotulinumtoxinA for hypersalivation in patients with amyotrophic lateral

- sclerosis: an open-label single-centre study. *J Neural Transm (Vienna)*.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-019-02044-6>
- Park, J. H., Elpers, C., Reunert, J., McCormick, M. L., Mohr, J., Biskup, S., . . . Marquardt, T. (2019). SOD1 deficiency: a novel syndrome distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, *142*(8), 2230-2237.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awz182>
- Pompl, P. N., Ho, L., Bianchi, M., McManus, T., Qin, W., & Pasinetti, G. M. (2003). A therapeutic role for cyclooxygenase-2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J*, *17*(6), 725-727.  
<https://doi.org/10.1096/fj.02-0876fje>
- Pun, S., Santos, A. F., Saxena, S., Xu, L., & Caroni, P. (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci*, *9*(3), 408-419. <https://doi.org/10.1038/nn1653>
- Qiu, T., Zhang, Y., Tang, X., Liu, X., Wang, Y., Zhou, C., . . . Zhang, J. (2019). Precentral degeneration and cerebellar compensation in amyotrophic lateral sclerosis: A multimodal MRI analysis. *Hum Brain Mapp*, *40*(12), 3464-3474.  
<https://doi.org/10.1002/hbm.24609>
- Reiser, M., Kuhn, F.-P., & Debus, J. (2004, 2006). Magnetresonanztomographie (MRT). In *Duale Reihe - Radiologie* (Vol. 2. Auflage, pp. 84-88). Georg Thieme Verlag KG.
- Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., . . . Consortium, I. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, *72*(2), 257-268.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.010>
- Ringer, C., Büning, L. S., Schäfer, M. K., Eiden, L. E., Weihe, E., & Schütz, B. (2013). PACAP signaling exerts opposing effects on neuroprotection and neuroinflammation during disease progression in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, *54*, 32-42.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.02.010>
- Ringer, C., Weihe, E., & Schütz, B. (2017). SOD1G93A Mutant Mice Develop a Neuroinflammation-Independent Dendropathy in Excitatory Neuronal Subsets of the Olfactory Bulb and Retina. *J Neuropathol Exp Neurol*, *76*(9), 769-778.  
<https://doi.org/10.1093/jnen/nlx057>
- Robberecht, W. (1992). Lack of improvement with ceftriaxone in motoneuron disease. In *Lancet* (Vol. 340, pp. 1096-1097). [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)93115-4](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)93115-4)
- Rocha, M. C., Pousinha, P. A., Correia, A. M., Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (2013). Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1(G93A) mice model of ALS start long before motor symptoms onset. *PLoS One*, *8*(9), e73846.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073846>

- Roque, A., Lajud, N., José Valdez, J., & Torner, L. (2019). Early-life stress increases granule cell density in the cerebellum of male rats. *Brain Res*, 146358. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146358>
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., . . . Deng, H. X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59-62. <https://doi.org/10.1038/362059a0>
- Rothstein, J. D., Martin, L. J., & Kuncl, R. W. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*, 326(22), 1464-1468. <https://doi.org/10.1056/NEJM199205283262204>
- Saberi, D., Ott, B., Dahlke, C., Matschke, V., Schmitt-John, T., & Theiss, C. (2016). The Spatiotemporal Pattern of Degeneration in the Cerebellum of the Wobbler Mouse. *J Neuropathol Exp Neurol*, 75(4), 347-357. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw005>
- Saccon, R. A., Bunton-Stasyshyn, R. K., Fisher, E. M., & Fratta, P. (2013). Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain*, 136(Pt 8), 2342-2358. <https://doi.org/10.1093/brain/awt097>
- Sala, G., Arosio, A., Conti, E., Beretta, S., Lunetta, C., Riva, N., . . . Tremolizzo, L. (2019). Riluzole Selective Antioxidant Effects in Cell Models Expressing Amyotrophic Lateral Sclerosis Endophenotypes. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 17(3), 438-442. <https://doi.org/10.9758/cpn.2019.17.3.438>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Seol, H. S., Lee, S. E., Song, J. S., Lee, H. Y., Park, S., Kim, I., . . . Jang, S. J. (2016). Glutamate release inhibitor, Riluzole, inhibited proliferation of human hepatocellular carcinoma cells by elevated ROS production. *Cancer Lett*, 382(2), 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.08.028>
- Sherwood, N. M., Krueckl, S. L., & McRory, J. E. (2000). The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr Rev*, 21(6), 619-670. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.6.0414>
- Shibata, N. (2001). Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Neuropathology*, 21(1), 82-92.
- Silva, I. S., Pedrosa, R., Azevedo, I. G., Forbes, A. M., Fregonezi, G. A., Dourado Junior, M. E., . . . Ferreira, G. M. (2019). Respiratory muscle training in children and adults with neuromuscular disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 9, CD011711. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011711.pub2>
- Smaga, I., Fierro, D., Mesa, J., Filip, M., & Knackstedt, L. A. (2020). Molecular changes evoked by the beta-lactam antibiotic ceftriaxone across rodent models

- of substance use disorder and neurological disease. *Neurosci Biobehav Rev*, 115, 116-130. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.05.016>
- Smith, L. G. (1992). Failure of ceftriaxone for amyotrophic lateral sclerosis. In *Lancet* (Vol. 340, pp. 379). [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91463-i](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91463-i)
- Stephenson, J., & Amor, S. (2017). Modelling amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 25-26, 35-44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2018.10.001>
- Szentléleky, E., Szegeczki, V., Karanyicz, E., Hajdú, T., Tamás, A., Tóth, G., . . . Juhász, T. (2019). Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Reduces Oxidative and Mechanical Stress-Evoked Matrix Degradation in Chondrifying Cell Cultures. *Int J Mol Sci*, 20(1). <https://doi.org/10.3390/ijms20010168>
- Tadic, V., Prell, T., Lautenschlaeger, J., & Grosskreutz, J. (2014). The ER mitochondria calcium cycle and ER stress response as therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci*, 8, 147. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00147>
- Takahashi, S., Morimoto, S., & Okano, H. (2019). [Ropinirole Hydrochloride, a Candidate Drug for ALS Treatment]. *Brain Nerve*, 71(9), 943-952. <https://doi.org/10.11477/mf.1416201386>
- Tan, R. H., Kril, J. J., McGinley, C., Hassani, M., Masuda-Suzukake, M., Hasegawa, M., . . . Halliday, G. M. (2016). Cerebellar neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis cases with ATXN2 intermediate repeat expansions. *Ann Neurol*, 79(2), 295-305. <https://doi.org/10.1002/ana.24565>
- Tarlarini, C., Lunetta, C., Mosca, L., Avemaria, F., Riva, N., Mantero, V., . . . Penco, S. (2015). Novel FUS mutations identified through molecular screening in a large cohort of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol*, 22(11), 1474-1481. <https://doi.org/10.1111/ene.12772>
- Totenhagen, J. W., Bernstein, A., Yoshimaru, E. S., Erickson, R. P., & Trouard, T. P. (2017). Quantitative magnetic resonance imaging of brain atrophy in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. *PLoS One*, 12(5), e0178179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178179>
- Trepel, M. (2015). Kleinhirn (Cerebellum). In *Neuroanatomie Struktur und Funktion* (6. Auflage ed.). ELSEVIER.
- Tu, S., Menke, R. A. L., Talbot, K., Kiernan, M. C., & Turner, M. R. (2019). Cerebellar tract alterations in PLS and ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 20(3-4), 281-284. <https://doi.org/10.1080/21678421.2018.1562554>
- Uenal, H., Rosenbohm, A., Kufeldt, J., Weydt, P., Goder, K., Ludolph, A., . . . Group, A. r. S. (2014). Incidence and geographical variation of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Southern Germany--completeness of the ALS registry Swabia. *PLoS One*, 9(4), e93932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093932>

- Ulfig, N. (2008). Kleinhirn (Cerebellum). In *Kurzlehrbuch Neuroanatomie* (pp. 117-125). Georg Thieme Verlag KG. <https://doi.org/10.1055/b-002-54082>
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., . . . Vaudry, H. (2009). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev*, *61*(3), 283-357. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001370>
- Wang, L., Gutmann, D. H., & Roos, R. P. (2011). Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Hum Mol Genet*, *20*(2), 286-293. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq463>
- Wu, C. H., Fallini, C., Ticozzi, N., Keagle, P. J., Sapp, P. C., Piotrowska, K., . . . Landers, J. E. (2012). Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, *488*(7412), 499-503. <https://doi.org/10.1038/nature11280>
- Yamanaka, K., Chun, S. J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D. H., . . . Cleveland, D. W. (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*, *11*(3), 251-253. <https://doi.org/10.1038/nn2047>
- Zou, Y. H., Guan, P. P., Zhang, S. Q., Guo, Y. S., & Wang, P. (2020). Rofecoxib Attenuates the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis by Alleviating Cyclooxygenase-2-Mediated Mechanisms. *Front Neurosci*, *14*, 817. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00817>

## 8 Anhang

Tabelle 9: Einzelwerte der histologischen Analyse der Purkinjezellzahlen pro Tier im Vergleich unter den Gruppen sowie eine Mittelwertberechnung

Gruppe	Messzeitpunkt	ID	Mittelwerte pro Tier	Mittelwert Gesamt
WT/WT	P60/70			
		E4436	10,65	
		E4438	10,21	
		E4440	10,7	
		E4442	9,8	10,34
	Endstadium			
		E4327	15,08	
		E4330	11,65	
		E4333	15,34	
		E4345	18,75	15,21
WT/KO	p60/70			
		E4444	13,08	
		E4446	10,38	
		E4448	10,36	
		E4450	10,36	11,05
	Endstadium			
		E4324	14,41	
		E4336	12,42	
		E4348	15,63	
		E4363	15,3	14,44
SOD1/WT	p60/70			
		E4452	8,03	
		E4454	8,2	
		E4456	9,87	
		E4458	9,49	8,90

Gruppe	Messzeitpunkt	ID	Mittelwerte pro Tier	Mittelwert Gesamt
	Endstadium			
		E4321	11,2	
		E4354	7,92	
		E4357	12,1	
		E4360	13,07	11,08
SOD1/KO	p60/70			
		E4460	9,03	
		E4462	9,65	
		E4464	7,58	
		E4466	5,98	8,06
	Endstadium			
		E4318	11,22	
		E4342	10,9	
		E4369	10,16	
		E4474	7,92	10,05

*Tabelle 10: MRT-Analyse der Parameter Querdurchmesser und Länge in coronarer Schnittführung*

Gruppe	Messzeitpunkt	Tiere	Querdurchmesser in mm (coronar)	Länge in mm (coronar)
WT/WT	p60/70	BB272	7,796	3,291
		BB273	7,760	3,262
		BB237	7,846	3,273
		BB246	7,837	3,445
		BB258	7,715	3,387
		BB286	7,941	3,230
		<b>Mittelwert</b>	<b>7,816</b>	<b>3,315</b>
WT/KO	p60/70	K341	7,525	3,115

Gruppe	Mess-zeitpunkt	Tiere	Querdurchmesser in mm (coronar)	Länge in mm (coronar)
		K342	7,428	3,061
		K343	7,619	3,071
		K353	7,821	3,008
		K371	7,788	3,078
		Mittelwert	7,636	3,067
SOD1/WT	p60/70	BB281	7,333	2,966
		BB282	7,408	3,292
		BB284	7,534	3,175
		BB256	7,537	3,083
		BB289	7,607	3,066
		BB291	7,689	3,411
		Mittelwert	7,518	3,166
SOD1/WT	Endstadium	BB064	7,754	3,144
	m	BB068	7,577	3,211
		BB112	7,709	3,052
		BB039	7,330	3,048
		BB047	7,478	3,293
		BB050	7,749	3,292
		BB071	7,399	3,379
		Mittelwert	7,571	3,203



Tabelle 11: Histologische Flächenberechnung

<b>Genotyp</b>	<b>Messzeitpunkt</b>	<b>Gewebeummer</b>	<b>Tier-ID</b>	<b>Wert (mm<sup>2</sup>)</b>
WT/WT	p60/70	E4436	I541	4,12
WT/WT	p60/70	E4438	I543	4,15
WT/WT	p60/70	E4440	I546	4,16
WT/WT	p60/70	E4442	I547	3,99
SOD1/WT	p60/70	E4452	I542	3,84
SOD1/WT	p60/70	E4454	I545	3,42
SOD1/WT	p60/70	E4456	I559	4,13
SOD1/WT	p60/70	E4458	I560	3,98
SOD1/KO	p60/70	E4460	I549	3,91
SOD1/KO	p60/70	E4462	I550	3,69
SOD1/KO	p60/70	E4464	I544	3,65
SOD1/KO	p60/70	E4466	I555	3,79
WT/KO	p60/70	E4444	I539	3,83
WT/KO	p60/70	E4446	I540	3,45
WT/KO	p60/70	E4448	I552	3,68
WT/KO	p60/70	E4450	I554	3,64
SOD1/WT	Endstadium	E4321	I486	4,98
SOD1/WT	Endstadium	E4354	I515	3,83
SOD1/WT	Endstadium	E4357	I529	3,15
SOD1/WT	Endstadium	E4360	I535	3,72
SOD1/KO	Endstadium	E4318	I485	3,68
SOD1/KO	Endstadium	E4342	I491	4,02
SOD1/KO	Endstadium	E4369	I528	3,88
SOD1/KO	Endstadium	E4474	I523	3,97

Tabelle 12: MRT Flächenberechnung

<b>Genotyp</b>	<b>Messzeitpunkt</b>	<b>Tier-IDs</b>	<b>Wert (mm<sup>2</sup>)</b>
WT/WT	p60/70	BB237	10,45
WT/WT	p60/70	BB246	10,32
WT/WT	p60/70	BB258	10,37
WT/WT	p60/70	BB272	10,38
SOD1/WT	p60/70	BB256	8,89
SOD1/WT	p60/70	BB281	9,35
SOD1/WT	p60/70	BB282	8,82
SOD1/WT	p60/70	BB284	9,56
SOD1/KO	p60/70	/	/
SOD1/KO	p60/70	/	/
SOD1/KO	p60/70	/	/
SOD1/KO	p60/70	/	/
WT/KO	p60/70	K341	9,365
WT/KO	p60/70	K342	9,449
WT/KO	p60/70	K343	9,317
WT/KO	p60/70	K353	9,545
SOD1/WT	Endstadium	BB039	8,936
SOD1/WT	Endstadium	BB047	9,511
SOD1/WT	Endstadium	BB050	7,512
SOD1/WT	Endstadium	BB064	8,271
SOD1/KO	Endstadium	/	/
SOD1/KO	Endstadium	/	/
SOD1/KO	Endstadium	/	/
SOD1/KO	Endstadium	/	/



## 9 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrenden waren:

### **Vorklinischer Studienabschnitt:**

Basler, Baranovski, Bauer, Bette, Bertoune, Braun, Brehm, Bonaterra, Cetin, Daut, Decher, del Rey, Eickmann, Feuser, Grundmann, Hildebrandt, Hobiger, Koolman, Lill, Löffler, Mey, Milani, Mueller, Neumüller, Oberwinkler, Oliver, Preisig-Müller, Reese, Rost, Röhm, Rust, Schütz, Schwarz, Seitz, Steiniger, Schratt, Suske, Thieme, Weihe, Wertenbruch, Westermann, Westermann, Wilhelm, Wrocklage

### **Klinischer Studienabschnitt:**

Aigner, Al-Fakhri, Arenz, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Becker, Bender, Best, Bien, Bliemel, Bohlander, Burchert, Cabanel, Carl, Czubayko, Damanakis, Dettmeyer, Divchev, Donner-Banzhoff, Duda, Ehlenz, Eming, Fendrich, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Gebhardt, Geks, Geraedts, Görg, Gress, Greulich, Grikscheit, Grimm, Grosse, Grzeschik, Hertl, Hoch, Höffken, Hofmann, Holland, Holzer, Hoyer, Jansen, Jerrentrup, Josephs, Kampmann, Kann, Keber, Kill, Kircher, Kirschbaum, Klemmer, Klose, Knipper, Koczulla, Köhler, König, Kühnert, Lohoff, Lüsebrink, Mahnken, Maier, Maisner, Maurer, Menzler, Moll, Morin, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oberkircher, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Parahuleva, Peterlein, Pfützner, Portig, Pöttgen, Plant, Rastan, Renke, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Rothmund, Ruchholtz, Rüschi, Schäfer, Schieffer, Schmeck, Schmidt, Schneider, Schu, Seifert, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sieveking, Sommer, Stuck, Strik, Swaid, Tackenberg, Thum, Timmermann, Timmesfeld, Vogelmeier, Vogt, Vojnar, Wagner, Werner, Wiesmann, Wissniowski, Wittig, Worzfeld, Wulf, Zavorotny, Zemlin, Ziller, Zimmer, Zwiorek

## **10 Danksagung**

Zum Abschluss meiner Dissertation möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während dieser Zeit unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Burkhard Schütz möchte ich ganz herzlich danken, dass er mir diese Promotion ermöglicht hat, immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und mir immer wertvolle Ratschläge geben konnte. Ohne die Zusammenarbeit wäre diese Forschungsarbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt auch Prof. R. Kinscherf, Prof E. Weihe und Dr. L. Eiden für die Möglichkeit der Nutzung von PACAP-defizienten Mäusen für die MRT Analysen.

Des Weiteren möchte ich mich persönlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für die Unterstützung, besonders in fachlichen Fragen und methodischen Abläufen, bedanken.

Die Arbeit, insbesondere die Akquirierung der Magnetresonanztomographie-Aufnahmen entstand in der Core Facility „Zentrum für bildgebende Forschung“ (ZebiF), in Zusammenarbeit mit der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Marburg (UKGM). Die Aufnahmen erfolgten durch Janine Schweigert.

