

**Präklinische Untersuchungen und
therapeutische Bewertung eines neuartigen
Peptidliganden im ALS spezifischen
SOD1*G93A Mausmodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Post-Schulz

aus Geldern

Düsseldorf, März 2021

aus dem Institut für Physikalische Biologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Dieter Willbold

2. Prof. Dr. Karl-Josef Langen

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Mai 2021

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ferner erkläre ich, dass ich in keinem anderen Dissertationsverfahren mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen.

Düsseldorf, 23.03.2021

(Julia Post-Schulz)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	XII
Abstract	XIV
1 Einleitung.....	1
1.1 Amyotrophe Lateralsklerose	1
1.1.1 Epidemiologie.....	2
1.1.2 Klinisches Bild und Symptomatik.....	2
1.1.3 Diagnose.....	3
1.1.4 Ätiologie	4
1.2 Tiermodelle der ALS Grundlagenforschung	6
1.2.1 Das transgene SOD1*G93A Mausmodell.....	6
1.3 Pathogenese der ALS.....	7
1.3.1 Oxidativer Stress.....	8
1.3.2 Exzitotoxizität	8
1.3.3 Mutiertes SOD1 Protein	9
1.3.3.1 Allgemein	9
1.3.3.2 Apoptose.....	10
1.3.3.3 Entzündung.....	10
1.3.3.4 Zytokine	12
1.4 Therapeutische Strategien zur Behandlung der ALS	13
1.4.1 Palliative Therapie.....	13
1.4.2 Zugelassene medikamentöse Therapien.....	13
1.4.3 Antioxidative Therapiestrategie	14
1.4.4 Antiinflammatorische Therapiestrategien.....	16
1.4.5 Gentherapie	17
1.4.6 Stammzellentherapie.....	18
1.4.7 Aminosäuren und Peptide als mögliche Wirkstoffe?	19
1.4.8 Warum nicht D-enantiomere Peptide als Medikamente nutzen?	20

1.4.8.1	Metabolismus und orale Bioverfügbarkeit von Peptiden	20
1.4.8.2	D-enantiomere Peptide	21
2	Zielsetzung	23
3	Manuskripte	25
3.1	<i>A novel anti-inflammatory D-peptide inhibits disease phenotype progression in an ALS mouse model</i>	25
3.2	<i>Oral treatment with RD2RD2 impedes development of motoric phenotype and delays symptom onset in SOD1*G93A transgenic mice</i>	50
4	Weitere Ergebnisse	82
4.1	Material und Methoden	82
4.1.1	Stellungnahme	82
4.1.2	Studienplan und Verhaltensanalysen	82
4.1.3	Peptid	95
4.1.4	Genotypisierung	95
4.1.5	Plasma	97
4.1.6	Organpräparation und Aufarbeitung des Gewebes	97
4.1.7	Immunhistochemie	97
4.1.8	Statistische Auswertungen	98
4.2	Ergebnisse	99
4.2.1	Charakterisierung des transgenen SOD1*G93A Mausmodells	99
4.2.1.1	Primäre Verhaltensanalysen	99
4.2.1.2	Motorische Verhaltensanalyse	103
4.2.1.3	Analyse des <i>M. gastrocnemius</i>	109
4.2.2	Kurative Therapiestudie	112
4.2.2.1	Primäre Verhaltensanalyse	112
4.2.2.2	Motorische Verhaltensanalyse	118
4.2.2.3	Histologische Untersuchungen	124
5	Diskussion	127
5.1	Charakterisierungsstudie	128
5.2	Präventive Therapiestudien	134
5.3	Kurative Therapiestudie	142
5.4	Fazit und Ausblick	146

Referenzen	i
Danksagung	xxxi
Liste der Publikationen.....	xxxiii
Liste der Posterpräsentationen	xxxiii
Druckgenehmigung.....	xxxv

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)	1
Abb. 2 Schematische Darstellung der Charakterisierungs- und kurativen Therapiestudie.....	85
Abb. 3 Der Offenfeld und die schematische Darstellung der analysierten Bereiche in der Test-Arena.	86
Abb. 4 SHIRPA-Test.	87
Abb. 5 Modifizierter Stabtest.	88
Abb. 6 Spreizreflextest der Hinterbeine.....	89
Abb. 7 Versuchsaufbau zum Messen der Greifstärke.	90
Abb. 8 Rotarod-Test.....	91
Abb. 9 Fußabdrucktest zur Analyse der Gangart.	93
Abb. 10 Verhaltensanalyse des SOD1*G93A Mausmodells im Offenfeldtest.	100
Abb. 11 Primäre Untersuchung des Körpergewichts und Beurteilung im SHIRPA- Test.....	102
Abb. 12 Untersuchungen der motorischen Leistung von nicht-transgenen und transgenen Mäuse, sowie Bestimmung des Zeitpunkts „Krankheitsbeginn“ der transgenen SOD1*G93A Versuchsgruppe.	105
Abb. 13 Charakterisierung der motorischen Leistung von transgenen SOD1*G93A Mäusen und nicht-transgenen Geschwistertiere im Rotarod-Test.	106
Abb. 14 Untersuchungen der Gangart im Fußabdrucktest.	109
Abb. 15 T1-gewichtetet MRT-Messung des <i>M. gastrocnemius</i> im Alter von 10 Wochen.....	110
Abb. 16 Gewichtsanalyse des <i>M. gastrocnemius</i> im Krankheitsverlauf.	111
Abb. 17 Analyse des Erkundungsverhaltens und der Bewegungsaktivität aller L- RD2RD2-behandelten Mäuse und Placebo-behandelter Geschwistertiere im Offenfeldtest.....	114
Abb. 18 Das Körpergewicht im Verlauf der Therapiestudie.	116
Abb. 19 Untersuchung des Allgemeinzustandes nach L-RD2RD2- oder Placebo-Gabe bei SOD1*G93A Mäusen und nicht-transgenen Geschwistertieren im SHIRPA-Test.	117
Abb. 20 Stagnation der motorischen Leistung bei L-RD2RD2-behandelten SOD1*G93A Mäusen in den motorische Tests.....	120
Abb. 21 Berechnung des Zeitpunktes “Krankheitsbeginn” und Überlebensanalyse der transgenen Behandlungsgruppen.	122

Abb. 22 Immunhistochemische Analyse der ALS-ähnlichen Pathologie im Hirnstamm und im motorischen Kortex nach Behandlung mit L-RD2RD2.....	124
--	-----

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Übersicht der El Escorial-Kriterien zur Diagnose der ALS.....	4
Tab. 2 Auflistung einiger selektierter D-enantiomerer Peptide und der L-enantiomeren Kontrollpeptide.	21
Tab. 3 Sequenzen verwendeter Primer für die qRT-PCR.....	96
Tab. 4 Programm der SOD1 qRT-PCR.....	96
Tab. 5 Zeitpunkt Krankheitsbeginn - Deskriptive Statistik und Normalverteilung der vier Behandlungsgruppen.	123
Tab. 6 Überlebenszeit - Deskriptive Statistik und Normalverteilung der vier Behandlungsgruppen.	123
Tab. 7 Analyse der ALS-ähnlichen Pathologie von L-RD2RD2- und Placebo-behandelten SOD1*G93A Mäusen und nicht-transgenen Geschwistertieren.	125

Abkürzungsverzeichnis

ΔC_t	Schwellenwert (engl. <i>delta threshold cycle</i>)
Abb.	Abbildung
ACC	N-Acetyl-L-cystein
AD	Alzheimer'sche Demenz
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ALSFRS	Funktionale ALS Bewertungsskala (engl. <i>Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale</i>)
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>analysis of variance</i>)
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (engl. <i>amyloid precursor protein</i>)
APP/PS1 Mäuse	Mausmodell mit Überexpression der Doppelmutation vom Amyloid-Vorläuferprotein (engl. <i>amyloid precursor protein</i>) und Präsenilin 1 (engl. <i>presenilin 1</i>)
ASO	Antisense-Oligonukleotide
ATP	Adenosintriphosphat
A β	Amyloid β
Bcl-2	Regulatorprotein der Apoptose (engl. <i>B-cell-lymphoma 2</i>)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
C9ORF72	Genetische Mutation, assoziiert mit der sALS und fALS (engl. <i>chromosome 9 open reading frame 72</i>)
Ca ²⁺	Kalzium (engl. <i>calcium</i>)
CAPE	Kaffeesäure-Phenethyl-Ester (engl. <i>caffeic acid phenethyl ester</i>)
CCL2	Unterfamilie der chemotaktischen Zytokine; die ersten zwei Cysteine folgen direkt aufeinander (engl. <i>CC-chemokine ligand 2</i>)
COX	Cyclooxygenase
CPP	Zellpenetrierende Peptide (engl. <i>cell-penetrating peptide</i>)
CXCL	Unterfamilie der chemotaktischen Zytokine, die ersten zwei Cysteine sind durch eine Aminosäure voneinander getrennt (engl. <i>C-X-C motif chemokine ligand 1</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EAAT2/GLT-1	Exzitatorischer Aminosäuretransporter-2 und Glutamatttransporter-1 (engl. <i>excitatory amino acid transporter 2 / glutamate transporter 1</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMG	Elektromyographie
fALS	Familiäre ALS

G93A	Punktmutation im SOD1 an Position 93, Tausch der Aminosäure Glycin gegen die Aminosäure Alanin
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
<i>M. gastrocnemius</i>	Zwillingswadenmuskel (latein. <i>Musculus gastrocnemius</i>)
MN	Motoneuron
MND	Motoneuronen Erkrankung (engl. <i>motor neuron disease</i>)
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stammzellen (engl. <i>mesenchymal stem cells</i>)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
ntg	nicht-transgen
OFT	Offenfeldtest (engl. <i>open field test</i>)
PC	Proteinkonvertasen (engl. <i>Protein convertase</i>)
PET	Positronenemissionstomographie
p.o.	latein. <i>per oral</i> "durch, über" und "Mund"
PTD	Protein Transduktionsdomäne (engl. <i>protein transduction domain</i>)
sALS	Sporadische ALS
SHIRPA	Verhaltenstest (engl. <i>SmithKline, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment</i>)
siRNA	Kurze RNA-Fragmente (engl. <i>small interfering RNA</i>)
SS-31	Szeto-Schiller-Peptid-31
SOD1	Superoxiddismutase 1
Tab.	Tabelle
TDP-43	Transaktivierungs-Antwortelement (engl. <i>Trans-activation Response (TAR)-DNA-bindendes Protein 43</i> (engl. <i>TAR-DNA binding protein 43</i>)
TG	Transgen
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
upm	Umdrehungen pro Minute
vs.	im Gegensatz zu (latein. <i>versus</i>)
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>)

Einbuchstabencode natürlich vorkommender Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
G	Glycin
H	Histidin
L	Leucin
N	Asparagin
P	Prolin
R	Arginin
T	Threonin

Zusammenfassung

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist durch die progressive Degeneration der Motoneuronen im zentralen Nervensystem gekennzeichnet. Klinisch führt die ALS zu einer Muskelschwächung durch Atrophie der Skelettmuskulatur bis hin zum Tod der Patienten, meist durch Atemstillstand. Eine heilende Behandlung der ALS gibt es bis heute nicht. Derzeit zugelassene Medikationen bewirken ausschließlich eine Verzögerung der klinischen Symptome und erweitern nur geringfügig die Überlebenszeit, ohne die kausale Ursache der Erkrankung zu behandeln.

Die Arbeiten unserer Forschungsgruppe zielen auf die Entwicklung kausaler Therapien gegen neurodegenerative Erkrankungen ab. Im Fokus unserer Forschung stehen dabei mittels Spiegelbild-Phagendisplay selektierte Peptidliganden, die nur aus D-enantiomeren Aminosäureresten bestehen. Eines dieser sogenannten „D-Peptide“ ist RD2RD2. In einer Therapiestudie mit einem Mausmodell der Alzheimer'schen Demenz zeigte die Behandlung mit RD2RD2 *in vivo* einen vielversprechend antiinflammatorischen Effekt. Zur Charakterisierung der potentiell antiinflammatorischen Wirkung von RD2RD2, wurde eine Erkrankung mit einem etablierten Tiermodell gesucht, in dem neuroinflammatorische Prozesse eine Funktion in der Krankheitsprogression spielen.

Obwohl die genaue Pathophysiologie der ALS bisher unbekannt ist, belegt eine zunehmende Anzahl von Studien, dass die Neuroinflammation in der Pathogenese der ALS ein Treiber der Krankheitsprogression ist, sowohl in Patienten, als auch in transgenen Mäusen mit einer Mutation im Gen, das für die Superoxiddismutase 1 (SOD1) kodiert, ist.

Die transgenen SOD1 Mäuse tragen multiple Genkopien des mutierten Transgens, das eine Punktmutation (G93A) in der DNA enthält und für SOD1 kodiert. Unter Verwendung von weiblichen transgenen SOD1*G93A Mäusen und nicht-transgenen Wildtyp Geschwistertieren wurde die ALS-ähnliche Pathogenese und die Entwicklung des motorisch-neurodegenerativen Phänotyps der Tiere in Verhaltens- und motorischen Koordinationstests über mehrere Wochen studiert und charakterisiert.

Anschließend an die Etablierung des SOD1*G93A Mausmodells, wurde in einer ersten präklinischen Studie (intraperitoneal) das therapeutisch antiinflammatorische Potential von RD2RD2 auf die Krankheitsprogression und Neuroinflammation *in vivo* untersucht. Placebo-behandelte, transgene und nicht-transgene Geschwistertiere dienten als Kontrollen. Die Behandlung der transgenen SOD1*G93A Mäuse verlangsamte die Progression des neurodegenerativen Phänotyps und reduzierte die motorischen Defizite, während sich der motorisch-neurodegenerative Phänotyp in der Placebo-behandelten

Gruppe über die Versuchsdauer entwickelte. Des Weiteren reduzierte die Behandlung mit RD2RD2 im Gehirn die Aktivierung von Gliazellen und beugte einer Degeneration von Neuronen vor.

In der zweiten Therapiestudie (*per oral*) wurde untersucht, ob RD2RD2 auch nach oraler Applikation therapeutisches Potential besitzt. Die orale Behandlung führte bei RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen zu einer signifikant gesteigerten Leistung in den Verhaltens- und motorischen Koordinationstests im Vergleich zu den Placebo-behandelten, transgenen Geschwistertieren. Zudem stagnierte die Entwicklung des neurodegenerativen Phänotyps in RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen. Immunhistochemische Analysen ergaben eine signifikante Reduktion aktivierter Gliazellen und eine Protektion reifer und cholinergischer Neurone im Gehirn von RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen, verglichen mit Placebo-behandelten, transgenen Geschwistertieren. Zusätzliche biochemische Analysen mittels eines Multiplex-Immunoassays wiesen eine Normalisierung verschiedener Zytokine im Plasma von RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen in Richtung der gemessenen Konzentrationen von nicht-transgenen Mäusen auf.

Zuletzt wurde eine Überlebensstudie durchgeführt. Hierbei wurde untersucht, ob die Behandlung mit RD2RD2 (*per oral*) einen Einfluss auf das Überleben der transgenen ALS Mäuse hat. Zusätzlich wurde eine Gruppe von nicht-transgenen Mäusen mit derselben Dosis RD2RD2 wie die transgenen Tiere täglich behandelt, um zu evaluieren, ob die Behandlung mit RD2RD2 unerwünschte Nebenwirkungen aufweist. Die in der Überlebensstudie gewonnenen Daten waren in Bezug auf die vorherigen Studienergebnisse nicht auswertbar. In einer nachträglichen Überprüfung der Peptidcharge stellte sich heraus, dass es sich bei dem angenommenen D-RD2RD2, um die L-enantiomere Form des Peptids handelte.

Die antiinflammatorischen und neuroprotektiven Effekte nach der Behandlung mit D-RD2RD2 im transgenen SOD1*G93A Mausmodell in den präklinischen Therapiestudien, qualifizieren D-RD2RD2 für die weitere Entwicklung und Prüfung einer krankheitsmodifizierenden Behandlung der ALS.

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is characterised by progressive degeneration of motor neurons in the central and peripheral nervous systems. Clinically, ALS leads to muscle weakness due to atrophy of the skeletal muscles and even death of patients, usually due to respiratory failure. To date, there is no curative treatment for ALS and currently approved treatments delay the clinical symptoms and marginally extend survival without targeting the cause of ALS.

Our research group works on the development of therapeutic compounds for the treatment of neurodegenerative diseases. We focus on peptide ligands selected by mirror image phage display, which consists solely of D-enantiomeric amino acid residues. One of these "D-peptides" is RD2RD2. A treatment study with a mouse model of Alzheimer's disease showed a remarkable anti-inflammatory effect of RD2RD2 *in vivo*. To characterise the potential anti-inflammatory effect of RD2RD2, it was sought a disease with an established experimental animal model wherein neuroinflammatory processes play a function in disease progression.

Although the underlying pathophysiology of ALS is still to a large extent unknown, an increasing evidence of studies demonstrate that neuroinflammation is a driver of disease progression in the pathogenesis of ALS patients and the transgenic SOD1 mouse models.

The transgenic mice carry multiple gene copies of a mutant transgene containing a point mutation (G93A) in the DNA encoding the superoxide dismutase 1 (SOD1). ALS-like pathogenesis and development of the neurodegenerative phenotype were studied in female transgenic SOD1*G93A mice and non-transgenic wildtype littermates (controls) using behavioural and motor coordination tests over several weeks.

Subsequent to the characterisation of the SOD1*G93A mouse model, a first preclinical *in vivo* study (intraperitoneal) was evaluated the therapeutic anti-inflammatory potential of RD2RD2 towards disease progression and neuroinflammation. Placebo-treated transgenic and non-transgenic littermates were used as controls. Treatment of SOD1*G93A transgenic mice prevented progression of the neurodegenerative phenotype and further motor deficits in compare to placebo-treated transgenic animals. Moreover, RD2RD2 treatment decreased glial cell activation in the brain and prevented degeneration of neurons.

A second treatment study (*per oral*) was examined whether RD2RD2 also has therapeutic potential after oral administration. Oral treatment significantly resulted in an increased performance of RD2RD2- vs placebo-treated SOD1*G93A mice in behavioural and motor

coordination tests. In addition, development of the neurodegenerative phenotype stagnated. Immunohistochemical analysis revealed a significant reduction in activated glial cells and neuroprotection of mature and cholinergic neurons in the brain of RD2RD2- vs placebo-treated SOD1*G93A mice. Additional biochemical analysis using a multiplex immunoassay indicated normalisation of several plasma cytokines in RD2RD2- vs placebo-treated SOD1*G93A mice towards concentrations found in non-transgenic littermates.

Thus, a survival study was performed. It was investigated whether the treatment with RD2RD2 (*per ora*) had an effect on the survival of the transgenic SOD1 mice. In addition, a group of non-transgenic littermates was treated daily with an equal dosage of RD2RD2 to evaluate whether RD2RD2 treatment had any adverse side effects. The data of survival study were not evaluable with regard to the previous studies. In a posterior examination of the peptide batch, it was discovered that the assumed D-peptide was actually the L-enantiomeric form of the peptide.

The anti-inflammatory and neuroprotective effects of D-RD2RD2 treatment of the first two therapy studies in the SOD1*G93A transgenic mouse model qualify D-RD2RD2 for further development and testing strategies towards a disease modifying treatment of ALS.

1 Einleitung

1.1 Amyotrophe Lateralsklerose

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine progressiv, neurodegenerative Erkrankung, die zur irreversiblen Zerstörung der oberen und unteren Motoneurone des zentralen Nervensystems führt (Kiernan et al., 2011). Erstmals im Jahre 1869 vom französischen Neurologe Jean-Martin Charcot als Innervationsverlust der Muskeln zusammen mit spastischen Kontraktionen beschrieben (Charcot, 1869), wurde das Krankheitsbild im Jahr 1874 als amyotrophe (griech. *a-*: nicht, *myo-*: Muskel, *trophein*: wachsen) Lateralsklerose (lat. *lateral*: seitlich; griech. *Sklerose*: Verhärtung) spezifiziert (Charcot, 1874). Im Verlauf der Krankheit kommt es zur degenerativen Zerstörung von Motoneuronen u.a. im primären motorischen Kortex, im Hirnstamm und im Rückenmark (Abb. 1). Weltweit wird die Krankheit unter dem Sammelbegriff Motoneuronen-Erkrankung (MND; engl. *motor neuron disease*) geführt und häufig als Charcot-Krankheit oder, nach einem erfolgreichen Baseballspieler der amerikanischen Sportgeschichte, Lou-Gehring-Krankheit bezeichnet (Wijesekera and Leigh, 2009).

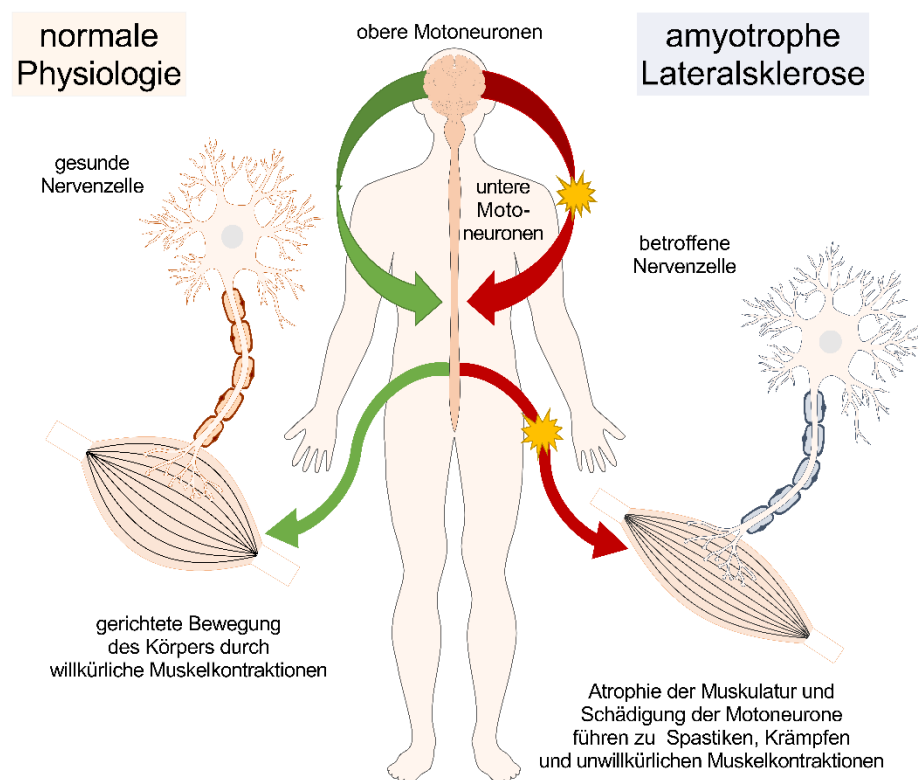


Abb. 1 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)

Während der Progression der ALS degenerieren die oberen und unteren Motoneurone irreversibel und progressiv. Als obere Motoneurone werden die motorischen Nervenzellen im Gehirn bezeichnet, die die Auslösung willkürlicher Bewegungen übertragen. Die Signale werden an die unteren

Motoneuronen im Rückenmark weitergeleitet, die die Signale direkt an den jeweiligen Muskeln übertragen. Bei der ALS degenerieren die Neurone, wodurch die willkürliche Steuerung der Muskulatur gestört wird. Quelle: Abbildung modifiziert nach *The ALS Association* (<http://www.alsa.org>).

1.1.1 Epidemiologie

In Europa liegt die Inzidenz an ALS zu erkranken zwischen 1,6 und 3,8 pro 100.000 Einwohnern (Uenal et al., 2014, Rosenbohm et al., 2017, Benjaminsen et al., 2018, Longinetti et al., 2018, Palese et al., 2019, Leighton et al., 2019, Opie-Martin et al., 2020). Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt 66 Jahren, wobei Männer mit durchschnittlich 64 Jahren früher an ALS erkranken als Frauen mit einem Durchschnittsalter von 67 Jahren. Obwohl ALS vermehrt zwischen dem 45. bis 75. Lebensjahr auftritt, sind Fälle deutlich jüngerer und älterer Patienten dokumentiert (Palese et al., 2019). Zudem sind Männer in Europa mit einem Verhältnis von durchschnittlich 1,2:1 etwas häufiger betroffen als Frauen. Die Prävalenz liegt bei 4 bis 8 pro 100.000 Einwohner mit steigender Tendenz bis zum Jahr 2050 (Arthur et al., 2016, Rosenbohm et al., 2017, Longinetti and Fang, 2019, Palese et al., 2019). Die durchschnittliche Lebenserwartung eines ALS Patienten beträgt zwischen 29 bis 50 Monaten (Benjaminsen et al., 2018).

1.1.2 Klinisches Bild und Symptomatik

In Folge der progressiven Degeneration der oberen und unteren Motoneuronen im Nervensystem bilden sich in der frühen Krankheitsphase klinisch differentielle Symptome aus. Die klinische Einteilung der ALS erfolgt nach dem Symptombeginn. Je nachdem welche Motoneurone von der Degeneration betroffen sind und dem Grad der Degeneration präsentiert sich die ALS klinisch in verschiedenen Formen: spinale und bulbäre ALS (Logroscino et al., 2010).

Etwa zwei Drittel aller ALS Patienten sind von der spinalen Form betroffen. Es treten Läsionen an den oberen und unteren Motoneuronen auf, die zu fokaler Muskelschwäche und -atrophien in den oberen und unteren Extremitäten der Arm- und Beinmuskulatur führen, gefolgt von spastischen Paresen (Hardiman et al., 2011). Die Symptome können distal oder proximal beginnen. Bei Patienten mit bulbär beginnender ALS, treten die ersten Symptome zunächst im Bereich der Gesichtsmuskulatur auf, was primär zu Sprach- und Schluckstörungen führt, gefolgt von muskulären Symptomen der Extremitäten (Makkonen et al., 2018). Die bulbäre ALS ist die aggressivste und am schnellsten fortschreitende Form und die Patienten haben eine kürzere Lebenserwartung im Vergleich zur spinalen ALS und weiterer Unterformen (Hardiman et al., 2011, Couratier et al., 2016). Eine dieser

Unterformen ist z.B. die respiratorische ALS, die weniger als > 3 % der Patienten betrifft (Shoesmith et al., 2007, Gautier et al., 2010). Im Gegensatz zur spinalen und bulbären Form, treten mit der Progression der respiratorischen ALS als erstes Symptome wie Atemnot und Kurzatmigkeit im Alltag auf, gefolgt von fokalen Muskelschwächen und -atrophien. Trotz der unterschiedlich auftretenden primären Symptomatik, sind die Paresen aller ALS Formen progressiv und führen im Verlauf der Erkrankung zum Tod durch respiratorische Insuffizienz (Wijesekera and Leigh, 2009).

Der Schweregrad der Erkrankung kann mit Hilfe der funktionalen ALS Bewertungsskala (ALSFRS; engl. *Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale*) eingeordnet werden (Brooks et al., 1996, Cedarbaum and Stambler, 1997). Die ALSFRS wurde zuletzt im Jahr 1999 revidiert und um spezifischere Angaben zur Respiration der ALS Patienten ergänzt (ALSFRS-R, R = revidierte Version) (Cedarbaum et al., 1999). Anhand von 10 (ALSFRS) bzw. 12 (ALSFRS-R) Kategorien wird der Schweregrad der ALS Erkrankung beurteilt und nach einem Punktesystem von 0 (schwerwiegend) bis 4 Punkten (normal) definiert. (Abdulla et al., 2013). Die Kategorien sind an das klinische Bild der ALS Patienten angepasst und lauten wie folgt: Sprache, Speichelfluss, Schlucken, Handschrift, Nahrungsaufnahme, Ankleiden und Körperpflege, Lagerung im Bett und Richten der Bettdecke, Gehen, Treppensteigen, Luftnot, Luftnot im Liegen und Atemfunktionsstörung. Der ALSFRS-R stellt somit ein einfaches und validiertes Bewertungssystem zur Überwachung und Einschätzung der Progression bei ALS Patienten dar.

1.1.3 Diagnose

Es gibt keinen validierten diagnostischen Test zur frühzeitigen Erkennung der ALS. Die Erkrankung kann erst diagnostiziert werden, wenn andere Ursachen ausgeschlossen sind, d.h. die Kombination von suggestiven klinischen Anzeichen mit negativen Labortests, sowie bildgebenden Untersuchungen auf andere Pathologien unterstützten die Diagnose. Die Voraussetzung hierfür ist immer die Progression der ALS. Faszikulationen und Muskelkrämpfe sind meist Initialsymptome der ALS, gelten allein jedoch nicht als spezifisch und ausreichend für eine Diagnosestellung (Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie e.V. (DGN); eine überarbeitete Fassung wird zum 30. April 2021 erwartet, Registernummer 030-001) (Ludolph, 2014). Aus diesem Grund wurden weitere diagnostische Parameter bestimmt und im Jahr 1994 als „El Escorial-Kriterien“ definiert (Tab. 1) (Brooks et al., 2000, Brooks, 1994). Die „El Escorial-Kriterien“ sind international standardisierte Diagnosekriterien der ALS, die von der *World Federation of Neurology* (WFN) *Research Subgroup on ALS/MND* festgelegt wurden (Brooks, 1994, Brooks et al., 2000, Ludolph et al., 2015). Im Jahr 2008 wurden die Kriterien um die „Awaji-Kriterien“

ergänzt (de Carvalho et al., 2008). Generell wird zwischen der sicheren, wahrscheinlichen, wahrscheinlich laborgestützten und möglichen ALS unterschieden (Ludolph, 2014). Im Rahmen der Kriterien werden die Symptome der Patienten in vier Körperregionen (bulbär, zervikal, thorakal oder lumbosakral) eingeordnet und die Patienten entsprechend der Symptomatik in den Regionen und unter Hilfenahme unterstützender bildgebender Untersuchungen beurteilt.

Tab. 1 Übersicht der El Escorial-Kriterien zur Diagnose der ALS.

EMG: Elektromyographie, 1. MN: obere Motoneurone, 2. MN: untere Motoneurone

Sichere ALS	Schädigungszeichen an den 1. und 2. MN in 3 von 4 Regionen
Wahrscheinliche ALS	Schädigungszeichen an den 1. und 2. MN in 2 von 4 Regionen, wobei die Schädigung des 2. MN rostral der Schädigung des unteren MN vorhanden sein müssen
Wahrscheinliche, laborgestützte ALS	Schädigungszeichen an den 1. und 2. MN in 1 von 4 Regionen, oder nur des oberen MN, sowie Anzeichen von Denervierungen in der EMG in mind. 2 Extremitäten
Mögliche ALS	Schädigungszeichen an den 1. und 2. MN in 1 von 4 Regionen
Bestätigtes Diagnosekriterium der ALS	Läsionen des 1. MN Läsionen des 2. MN inkl. EMG-Veränderungen in klinisch nicht betroffenen Muskelpartien, Progredienz
Diagnostisches Fehlen klinischer Anzeichen für ALS	Autonome Dysfunktion, Gefühlsstörungen, Sehstörungen, Sphinkterstörungen, Parkinson-Syndrom, Alzheimer'sche Demenz oder etwaige Erkrankungen, die der ALS ähnlich sind
Diagnostische Anzeichen der ALS	Faszikulation in einer oder mehreren Regionen, neurogene Veränderung in der EMG, normale motorische und sensible Nervenleitgeschwindigkeiten, Fehlen von Leitungsblöcken

1.1.4 Ätiologie

Die Ätiologie der ALS Krankheit ist vielseitig und bis heute trotz vielseitiger Forschung immer noch nicht eindeutig geklärt. Diskutiert wird ein multifaktorieller Zusammenhang genetischer Prädispositionen und Umweltfaktoren, die zum Ausbruch der ALS führen (Majoor-Krakauer et al., 2003, Ingre et al., 2015). Daher werden die meisten Fälle als sporadische Form (sALS) deklariert. Bei der sALS wirken verschiedenste genetische und umweltbezogene Faktoren zusammen, wodurch das Risiko erhöht ist, an ALS zu erkranken und zudem eine frühzeitige Diagnose schwer prognostizierbar ist (Dunckley et al., 2007,

Oskarsson et al., 2015). Neben der großen Mehrheit an sALS Patienten, werden etwa 10 % aller an ALS erkrankten Personen der familiären ALS (fALS) zugeordnet. Der fALS liegen Genmutationen zu Grunde, wodurch sicherere Diagnosen gestellt werden können im Gegensatz zur sALS (Renton et al., 2014, Boylan, 2015). Darüber hinaus ist die fALS durch einen früheren Erkrankungsbeginn gekennzeichnet (Kiernan et al., 2011, Mehta et al., 2019). Bislang konnte eine Vielzahl an Genen mit der fALS in Verbindung gebracht werden (Renton et al., 2014) und darüber hinaus in einigen Fällen mit der sALS (Taylor et al., 2016). Ein Beispiel ist hierfür die Superoxiddismutase 1 (SOD1, Genlokus auf Chromosom 21q22.11). Die SOD1 Genmutation wurde sowohl bei fALS Patienten, als auch bei 2 % der sALS Patienten nachgewiesen (Rosen et al., 1993, Renton et al., 2014, Taylor et al., 2016). Seit der Entdeckung wurden mehr als 150 SOD1 Mutationen beschrieben (online Datenbank ALSoD; *Amyotrophic Lateral Sclerosis online Database*, <https://alsod.ac.uk/>, SOD1, Stand: 22.03.2021). SOD1 besteht aus 153 Aminosäuren und ist eines von drei Isoformen aus der Gruppe der Superoxiddismutasen (SOD1, SOD2 und SOD3). Die SOD1 befindet sich primär im Zytosol, kann jedoch auch im Intermembranraum der Mitochondrien und im Zellkern vorkommen. Unter normalen physiologischen Umständen liegt SOD1 als Homodimer, bestehend aus zwei identischen Untereinheiten vor, welche jeweils ein Kupfer- und Zinkion gebunden haben (Banci et al., 2008). Die primäre Funktion der Dismutase ist die Katalyse der aus der Zellatmung entstandenen Superoxidradikale in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid, womit SOD zum Abbau reaktiver Sauerstoffspezies beiträgt (Apel and Hirt, 2004, Tsang et al., 2014). Die mutierte Form der SOD1 liegt bei ALS Patienten als Heterodimer vor und wird autosomal-dominant vererbt (Rosen et al., 1993). Der Pathomechanismus der SOD1-assoziierten ALS ist bislang nicht vollständig entschlüsselt (Park et al., 2019). In den letzten Dekaden sind viele weitere Genmutationen entdeckt worden, u.a. im *TAR-DNA binding protein 43* (TDP-43), sowie im „Hexanukleotid“ *chromosome 9 open reading frame 72* (C9ORF72) (Neumann et al., 2006, Renton et al., 2011). Mit 40 % aller fALS und 7 % aller sFALS Fällen ist die C9ORF72 Mutation die bis heute am häufigsten vorkommende Genmutation (Renton et al., 2014). Aufgrund der frühzeitigen Entdeckung der SOD1 Genmutation und dem Nachweis in fALS und sALS Patienten, wurde die Mutation in den letzten Jahrzehnten intensiv studiert (Deng et al., 1993, Banci et al., 2008, Roberts et al., 2013). Zur Untersuchung der ALS Pathologie wurden transgene Tiermodelle entwickelt, die durch die Einbringung der humanen SOD1 Genmutation eine selektive Neurodegeneration entwickeln.

1.2 Tiermodelle der ALS Grundlagenforschung

Genetisch modifizierte Tiermodelle sind ein Hilfsmittel zum Studium der Grundlagenforschung, pathologischer Prozesse und um die therapeutische Wirksamkeit neuer Substanzen *in vivo* zu erforschen. Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurden zahlreiche Tiermodelle entwickelt und intensiv studiert, wie Modelle mit *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, Zebrafische, Ratten, Mäuse, Hunde, u.v.m. (Aoki et al., 2005, Awano et al., 2009, Joyce et al., 2011, Morrice et al., 2018, De Giorgio et al., 2019). Zur wissenschaftlichen Erforschung relevanter pathologischer Prozesse der ALS und um der humanen Krankheitssituation so nah wie möglich zu kommen, werden humane Gene eingebracht, die humane krankheitsverursachende Mutationen tragen, wie z.B. die SOD1 Genmutation (Joyce et al., 2011, Morrice et al., 2018). Vor allem das transgene SOD1 Mausmodell zeigt in seiner Pathogenese viele mit der humanen ALS vergleichbare Symptome (Alexianu et al., 2001, Bendotti and Carri, 2004, Acevedo-Arozena et al., 2011, Beers et al., 2011a). Aufgrund der Ähnlichkeit humaner klinischer Merkmale und Pathologie während der Krankheitsprogression wurde die SOD1 Mauslinie in den letzten zwei Jahrzehnten intensiv charakterisiert und weiterentwickelt, um der humanen Pathologie möglichst genau zu entsprechen und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu ermöglichen (Wong et al., 1995, Bruijn et al., 1997, Friedlander et al., 1997, Dal Canto and Gurney, 1997, Shibata, 2001, Deitch et al., 2014).

1.2.1 Das transgene SOD1*G93A Mausmodell

Das transgene SOD1 Mausmodell ist eines der ersten entwickelten ALS Tiermodelle. Aufgrund der Kodierung auf Chromosom 21 wurde das transgene Mausmodell bereits Ende der 1980er Jahre als Modell für die Down-Syndrom-Forschung entwickelt (Epstein et al., 1987). Mit der Entdeckung verschiedener Genmutationen der SOD1 als Auslöser der fALS und sALS (Rosen et al., 1993, Deng et al., 1993, Robberecht et al., 1996, Boukaftane et al., 1998), erlangte die Entwicklung transgener SOD1 Mausstämme Priorität.

Zur Untersuchung der Neuropathologie und der Progression der ALS, sowie zur Erforschung der Funktion der mutierten SOD1 bei der Krankheitsentwicklung, generierte Mark E. Gurney zusammen mit Kollegen im Jahr 1994 die transgene SOD1*G93A Mauslinie (Gurney et al., 1994). Das Transgen der Mäuse beinhaltet das humane SOD1 Gen mit einer Punktmutation an der Position 93 an der die Aminosäure Glycin gegen die Aminosäure Alanin getauscht wurde (G93A) unter dem humanen Promotor.

Die transgenen SOD1*G93A Mäuse entwickeln während der ALS-ähnlichen Progression eine Neurodegeneration im Hirnstamm und lumbalen Rückenmark (Gurney et al., 1994,

Wang et al., 2008, Özdinler et al., 2011, Fogarty et al., 2015). In Folge dessen treten motorische Defizite in den Extremitäten auf, die zu Paresen bis hin zur vollständigen Paralyse führen. Die fortschreitende degenerative Veränderung kann mittels Magnetresonanztomographie (MRT) ab einem Alter von 60 Tagen im Gehirn, genauer an den motorischen Kernen vom Hirnnerv V (*N. trigeminus*), VII (*N. facialis*) und XII (*N. hypoglossus*), sowie die folgende Muskeldegeneration in den Hinterbeinen bedingt durch die irreversible Zerstörung im lumbalen Rückenmark (Mead et al., 2011, Evans et al., 2014) detektiert werden. Der Zeitpunkt des Krankheitsbeginnes, an dem die ersten ALS-ähnlichen Symptome auftreten, ist direkt abhängig von der vorliegenden Anzahl der humanen SOD1*G93A Genkopien im transgenen Mausmodell (Alexander et al., 2004). Wie bei ALS Patienten kommt es auch im Mausmodell im Laufe der Krankheitsprogression zur Abnahme des Körpergewichts (Evans et al., 2014). Zusätzlich zu der klinischen Symptomatik sind Neuroinflammation und inflammatorische Prozesse weitere prominente Charakteristika der humanen ALS, die im SOD1*G93A Mausmodell reflektiert werden (McGeer and McGeer, 2002, Beers et al., 2011b, Lewis et al., 2012, McCauley and Baloh, 2019).

In der vorliegenden Arbeit wurde die kongene Mauslinie B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J verwendet (weiter abgekürzt als SOD1*G93A). Die Mäuse werden durch die Rückkreuzung transgener B6.SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur Mäuse mit nicht-transgenen C57BL/6J Mäusen generiert. Als kongen werden Inzuchtstämme von Mäusen bezeichnet, die sich nur in einem definierten Merkmal vom Vorläuferstamm unterscheiden (Rogner and Avner, 2003). Dies wird durch wiederholtes Einkreuzen des bestimmten Genes in den Inzuchtstamm erreicht. Ein Stamm gilt als kongen, wenn dieser mindestens zehnmal auf den Hintergrundstamm zurückgekreuzt wurde. In diesem Fall tragen die B6.Cg.Tg(SOD1*G93A)1Gur/J dieselbe transgene Mutation (SOD1*G93A), jedoch auf einem C57BL/6J-kongenem Hintergrund. Die kongenen SOD1*G93A Mäuse weisen eine geringfügigere Variabilität im Phänotyp auf als die ursprüngliche B6SJL bzw. B6SJL/J-Linie, sowie zwischen den beiden Geschlechtern, einen milderen und verzögerten Krankheitsbeginn mit erhöhter Überlebenszeit und einer länger andauernden Krankheitsdauer (Heiman-Patterson et al., 2005, Wooley et al., 2005, Mead et al., 2011). Die pathologischen Veränderungen können über einen längeren Zeitraum studiert werden und es ergibt sich ein größeres therapeutisches Zeitfenster.

1.3 Pathogenese der ALS

Oxidativer Stress, Exzitotoxizität und das mutierte SOD1 Protein sind drei von einigen diskutierten Pathomechanismen, die als ursächlich betrachtet werden, an dem Degenerationsprozess der Motoneuronen und der damit einhergehenden Progression der ALS verantwortlich zu sein. Inwieweit die Degeneration der Motoneurone durch den

jeweiligen Pathomechanismus betroffen ist und wie genau es sich auf die Progression der ALS auswirkt, ist bis heute nur in Ansätzen erforscht.

1.3.1 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress entsteht, wenn in einer Zelle durch eine Störung der mitochondrialen Atmungskette, der Sauerstoff- und Energiehaushalt oder der Abbau toxischer Sauerstoffradikale gestört werden. Eine verminderte Abbaurate reaktiver Sauerstoffspezies, äußere Einflüsse (H_2O_2 oder Glutamat) und intrazelluläre Störungen (Gendefekte/Mutationen) können zu einer Akkumulation toxischer Sauerstoffprodukte führen oder zur verminderten Fähigkeit des Abbaus z.B. durch den Verlust enzymatischer Aktivität (SOD1). Eine Theorie zur Entstehung von oxidativem Stress im Zusammenhang mit SOD1 assoziierter fALS ist, dass das Kupferion eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese hat. Das Vorhandensein von Kupfer in SOD1 ist entscheidend, da Kupfer als redoxaktives Metallion, als potenter Katalysator von Oxidationsreaktionen wirkt. Kommt es zur intrazellulären Anhäufung von Kupfer, könnte dies einen toxischen Einfluss auf die Mitochondrien haben und oxidativen Stress verursachen. Das Kupferionen einen Einfluss auf die Pathogenese anderer neurodegenerativer Erkrankungen haben, belegen verschiedene Studien (Gaggelli et al., 2006, Giampietro et al., 2018). Eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit oxidativem Stress haben Mitochondrien. Die Schädigung des Mitochondriums führt zur Freisetzung des Proteins Cytochroms c und dem Verlust der Bindung an Cardiolipin (Kroemer and Reed, 2000, Guégan et al., 2001). In Folge dessen wird über die Aktivierung von Kaspasen die Apoptose in der Zelle induziert. Allerdings ist noch nicht bekannt, inwieweit sich die Freisetzung mitochondrialen Cytochrom c auf die Progression der ALS Pathogenese auswirkt.

1.3.2 Exzitotoxizität

Ein weiterer seit Jahren diskutierter Pathomechanismus ist die Exzitotoxizität, die durch eine zu hohe Konzentration an Neurotransmitter wie z.B. Glutamat im zentralen Nervensystem entsteht (Danbolt, 2001). Durch die Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt steigt die Glutamatkonzentration hier kurzfristig an, die eine schnelle Wiederaufnahme erfordert, um eine Sättigung der Glutamat-Rezeptoren zu verhindern und zur Vermeidung der neurotoxischen Wirkung dieser exzitatorischen Aminosäure. Weder durch enzymatischen Abbau, noch durch Diffusion kann Glutamat in ausreichender Schnelligkeit und Menge metabolisiert werden. Die Glutamatkonzentration wird über den exzitatorischen Aminosäuretransporter-2 und Glutamatttransporter-1 (EAAT2/GLT-1; engl. *excitatory amino acid transporter 2 / glutamate transporter 1*) im synaptischen Spalt

reguliert. Sowohl bei Patienten der fALS und sALS, als auch im transgenen Mausmodell wurde gezeigt, dass es im Verlauf der Erkrankung zum Verlust des EAAT2/GLT-1 kommt (Rothstein et al., 1992, Rothstein et al., 1995, Fray et al., 1998). In Folge dessen, steigt die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt an und führt nachfolgend zu einer abnormen Übererregung der Motoneurone mit toxischem Effekt (Exzitotoxizität). Durch die andauernde Ausschüttung des Glutamats im synaptischen Spalt werden die ionotropen Glutamatrezeptoren N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) und α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure (AMPA) auf den Motoneuronen überstimuliert. Der daraus resultierende exzessive Ca^{2+} Einstrom hat Einfluss auf Ionenströme, enzymatische Reaktionen oder die Mitochondrien (Grosskreutz et al., 2010). Der Anstieg der Ca^{2+} Konzentration in Mitochondrien nach NMDA-Aktivierung erniedrigt den elektrochemischen Gradienten und vermittelt eine verminderte ATP-Synthese (Dyken, 1994). Die mitochondriale Schädigung initiiert die Aktivierung proapoptotischer Gene wie z.B. den *Apoptotic protease activating factor 1*, die die Apoptose einleiten (Léveillé et al., 2010, Caldeira et al., 2014). Die Entdeckung des Natrium-Kanal-Blockers Riluzol oder auch 6-(Trifluormethoxy)-1,3-benzothiazol-2-amin (Bensimon et al., 1994), und dessen antiglutamaterge Wirkung, stützt die Theorie, dass die Exzitotoxizität bei der Progression der ALS eine entscheidende Rolle spielt.

1.3.3 Mutiertes SOD1 Protein

1.3.3.1 Allgemein

Ein weiterer pathogener Faktor sind Mutationen im SOD1 Protein. Im Jahr 1993 wurde die krankheitsauslösende SOD1*G93A Mutation in ALS Patienten entdeckt (Rosen et al., 1993). Es wurde geschlussfolgert, dass die Mutation im SOD1 Protein zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität führt und dass es zu einer Zunahme toxischer, freier Radikale kommt („*Loss of function*“ Theorie) (Gurney et al., 1994, Bowling et al., 1995). Die Theorie wurde verworfen, nachdem an SOD1 knockout Mäusen belegt werden konnte, dass die Tiere keine motorischen Defizite entwickelten und länger lebten als die transgenen Geschwistertiere, die die humane SOD1 Mutation exprimierten (Reaume et al., 1996). Entgegen dieser Theorie wurde nachgewiesen, dass die enzymatische Dismutase-Aktivität unbeeinträchtigt oder sogar erhöht vorlag (Gurney et al., 1994, Wong et al., 1995). Aus diesen Erkenntnissen wird wiederum geschlussfolgert, dass Mutationen im SOD1 Gen das Protein mit toxischen Eigenschaften ausstatten, die zur Degeneration der Motoneurone führen. Dieser Funktionsgewinn wird als „*Gain of function*“ bezeichnet und soll unabhängig von der enzymatischen SOD1 Aktivität für die Pathogenese der ALS verantwortlich sein. Unklar ist bis heute der Mechanismus der neugewonnenen Eigenschaften des mutierten

SOD1 Proteins (Trist et al., 2020). Bislang ist nachgewiesen, dass bei SOD1-assoziiierter ALS fehlgefaltetes SOD1 Protein im Zytoplasma von Astrozyten und Motoneuronen anreichert wird und die Progression des motorisch-neurodegenerativen Phänotyps in SOD1 Mäusen beschleunigt (Bruijn et al., 1997). Zytoplasmatische Proteinaggregate mutierter SOD1 wurden in Patienten der sALS und fALS, als auch im transgenen Mausmodell nachgewiesen. Darüber hinaus zeigen SOD1 Aggregate eine prionenartige Zell-zu-Zell-Ausbreitung, wie auch für andere neurodegenerative Erkrankungen gezeigt werden konnte (Münch et al., 2011, Grad et al., 2011).

1.3.3.2 Apoptose

Ein Pathomechanismus, der durch die Mutation im SOD1 Protein getriggert wird, ist die Apoptose. Unter normalen physiologischen Umständen dient der programmierte Zelltod der Beseitigung defekter Zellen, die eine Gefahr für den Organismus darstellen (Reed, 2000). In ALS Patienten und im SOD1 Mausmodell wurde die Auslösung der Apoptose über die Aktivierung des Proteins p53 nachgewiesen (Martin, 2000, Yang et al., 2020). Ebenfalls wurde die Aktivierung der Caspase-1 und Caspase-3 nachgewiesen, welche bei der Auslösung der apoptotischen Reaktion in transgenen SOD1*G93A Mäusen beteiligt sind (Pasinelli et al., 2000). Die Inhibierung der Caspase-1 und Caspase-3 bewirkt eine Verzögerung des Krankheitsbeginns und eine Verlangsamung der Pathogenese in transgenen ALS Mäusen im Vergleich zu nicht-behandelten Geschwistertieren (Zhu et al., 2002). Zudem wird vermehrt Caspase-1 im frühen Stadium der Krankheit in transgenen SOD1*G93A Mäusen exprimiert (Yoshihara et al., 2002). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass eine Überexpression des antiapoptotischen Regulatorproteins *B-cell-lymphoma 2* (Bcl-2) oder die Inhibierung des proapoptotischen Proteins *Bcl-2 associated X* (Bax) im transgenen SOD1*G93A Mausmodell zu einer Verzögerung der ALS Erkrankung und einer verlängerten Überlebenszeit führt (Kostic et al., 1997, Gould et al., 2006).

1.3.3.3 Entzündung

Eine weitere, wichtige pathomechanistische Beobachtung ist, die durch aktivierte Mikroglia entstehenden Entzündungsreaktionen im zentralen Nervensystem, die sowohl bei transgenen Modellen mutierter SOD1 als auch in einem C9ORF72 Knockout-Mausmodell nachgewiesen wurde (Henkel et al., 2009, O’rourke et al., 2016). Entzündung oder Inflammation ist der Versuch eines Organismus sich selbst zu schützen, indem eine körpereigene Reaktion eingeleitet wird mit dem Ziel beschädigte Zellen, Krankheitserreger oder Toxine zu entfernen und anschließend den Heilungsprozess einzuleiten. Gliazellen wie Astrozyten und Mikroglia, sind nicht-neuronale Zellen, die die neuronale Homöostase

unterstützen, schützen und neuroinflammatorische Prozesse aktivieren (Henkel et al., 2009, Philips and Rothstein, 2014, Hensley et al., 2006).

Es gibt Hinweise darauf, dass mutiertes SOD1 in Astrozyten, Mikrogliazellen und Makrophagen den Krankheitsverlauf beschleunigt und in Motoneuronen primär den Beginn sowie die frühe Phase der Erkrankung bedingt (Beers et al., 2006, Boillée et al., 2006, Yamanaka et al., 2008). Als eine Reaktion auf Zellschädigungen in der Umgebung, ändern Mikroglia ihre Konformation, wandern zu diesen Zellen und setzen dort u.a. proinflammatorische Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies frei, die den Prozess der Phagozytose einleiten, wodurch es zur neuronalen Dysfunktion bis hin zum Absterben der Neurone kommt (Heneka et al., 2015). Andererseits, produzieren Mikrogliazellen antiinflammatorische Zytokine sowie neurotrophe Faktoren, was eine neuroprotektive Funktion während des inflammatorischen Prozesses vermuten lässt (Henkel et al., 2009).

Mittels Positronenemissionstomographie (PET) konnte die Aktivierung von Mikrogliazellen u.a. im primären Motorkortex, im Hirnstamm und Rückenmark von ALS Patienten abgebildet werden (Turner et al., 2004, Corcia et al., 2012, Tondo et al., 2020). Bestätigt wurden die Funde durch Analysen von *post mortem* Gewebe von ALS Patienten, die eine erhöhte Anzahl reaktiver Mikrogliazellen im primären Motorkortex und ventralen Horn des Rückenmarks aufwiesen (Kawamata et al., 1992). *Turner et al.* (2004) postulierten zudem eine positive Korrelation der Mikroglia-Aktivierung in Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung (Turner et al., 2004). Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen der Krankheitsprogression und der Aktivierung von Mikrogliazellen im ventralen Horn des Rückenmarks in transgenen SOD1*G93A Mäusen festgestellt werden (Alexianu et al., 2001).

Astrozyten erfüllen unter physiologischen Umständen schützende und regulatorische Funktionen im Organismus, z.B. bei der Immunabwehr in Zusammenarbeit mit der Blut-Hirn-Schranke (BHS), bei der Ausschüttung neurotropher Komponenten oder bei der Wiederaufnahme ausgeschütteter Neurotransmitter wie z.B. Glutamat (Sofroniew and Vinters, 2010).

Während der Progression der ALS entwickeln Astrozyten einen reaktiven Charakter aufgrund sich ändernder pathologischer Umstände auf molekularer und morphologischer Ebene (Nagy et al., 1994, Pehar et al., 2017), durch welche es zum Absterben von Motoneuronen kommen kann (Bruijn et al., 1997, Hall et al., 1998, Henriques et al., 2010). Aktivierte Astrozyten sezernieren Komponenten, wie den Nervenwachstumsfaktor, durch die eine apoptotische Reaktion induziert wird, die zur Degeneration von Motoneuronen führt (Pehar et al., 2017). In ALS Patienten und im transgenen SOD1*G93A Mausmodell sind

reaktive Astrozyten im Rückenmark lokalisiert (Yamanaka et al., 2008, Haidet-Phillips et al., 2011, Philips and Rothstein, 2014). Darüber hinaus finden sich reaktive Astrozyten in der weißen und grauen Substanz und im Motorkortex von ALS Patienten (Kushner et al., 1991, Nagy et al., 1994). Im transgenen SOD1*G93A Mausmodell konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von Astrozyten simultan mit Degeneration von Motoneuronen stattfindet und dass die Anzahl reaktiver Astrozyten positiv mit der phänotypischen Krankheitsprogression korreliert (Hall et al., 1998). Astrozyten werden andererseits durch degenerierende Motoneurone beeinflusst (Rao and Weiss, 2004, Rudnick et al., 2017), die durch z.B. die intrazelluläre Aggregation von SOD1, oxidativen Stress, Exzitotoxizität oder mitochondrialer Dysfunktion geschädigt werden (Rothstein, 2009).

1.3.3.4 Zytokine

Als Reaktion auf die Aktivierung von Gliazellen werden Entzündungsmediatoren sezerniert wie z.B. Zytokine (Elliott, 2001, Hensley et al., 2002). Eingeteilt in zwei verschiedene Typen (Typ-I: proinflammatorisch und Typ-II: antiinflammatorisch), sind Zytokine an komplexen Signalkaskaden beteiligt, die als Antwort zu einer Steigerung oder Erniedrigung des inflammatorischen Prozesses führen (Turner et al., 2014). Indessen kann eine pathologische Überexpression der Zytokine dem Heilungsprozess gegenüber auch nachteilig sein, anstatt diesem zu nützen (Papadimitriou et al., 2010). Zu der Familie der Zytokine gehören Interleukine (z.B. IL-1, IL-4, IL-6, IL-10), Chemokine (z.B. CCL2, CCL5), Interferone (z.B. INF- γ), Tumornekrosefaktoren (z.B. TNF- α), Wachstums- und koloniestimulierende Faktoren (z.B. G-CSF) (Turner et al., 2014).

Im lumbalen Rückenmark von transgenen SOD1*G93A Mäusen konnte gezeigt werden, dass bereits im Alter von 11 Wochen (späte präsymptomatische ALS Phase) eine gesteigerte Expression von TNF- α und Caspase-1 vorlag (Yoshihara et al., 2002). Erhöhte Expressionslevel weiterer Zytokine, wie IL-6, IFN- γ oder Chemokine, wie CCL5, konnten ebenfalls nachgewiesen werden (Hensley et al., 2003, Nguyen et al., 2004). Sowohl bei ALS Patienten, als auch im transgenen Tiermodell liegen erhöhte Zytokinkonzentrationen im CSF und Blut vor (Kuhle et al., 2009, Fiala et al., 2010, Tortelli et al., 2020, Torres et al., 2020, Moreno-Martinez et al., 2019). Pro- und antiinflammatorische Zytokine werden je nach Stadium der ALS in unterschiedlichen Konzentrationen sezerniert (Elliott, 2001, Jeyachandran et al., 2015).

1.4 Therapeutische Strategien zur Behandlung der ALS

Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten, gibt es bis heute keine neuroprotektive (kausale) Therapie, die das Fortschreiten der ALS Erkrankung effektiv verlangsamt oder stoppt.

1.4.1 Palliative Therapie

Bisher stehen nur symptomatische und geringfügig lebensverlängernde Behandlungen zur Verfügung (Dorst et al., 2017). Eine symptomorientierte (palliative) Therapie soll die Lebensqualität und Autonomie des Patienten gewährleisten. Hierfür ist eine kontinuierlich, intensive Betreuung der Patienten notwendig. Nach den Leitlinien der DGN werden die begleitende Physiotherapie, Logopädie und Ergotherapie, sowie die nicht-invasive maschinelle Unterstützung der Atmung und künstlicher Ernährung empfohlen (Ludolph, 2014). Des Weiteren wird z.B. der Einsatz von Schmerzmitteln zur Behandlung von Muskelkrämpfen empfohlen oder die Injektion von Botulinumtoxin in die Speicheldrüse gegen das unwillkürliche Abfließen von Speichel, welches eine Pneumonie verursachen kann (Ludolph, 2014, Miller and Appel, 2017). Bei auftretenden Schluckstörungen wird eine Ernährungsberatung empfohlen, sowie die Anpassung der Nahrung an die jeweilige Situation. Neben den körperlich orientierten Therapien werden ALS Patienten und Angehörige häufig psychologisch betreut. Mit der Progression der ALS kommt es vermehrt zu Angstzuständen und Depressionen, die mit Antidepressiva und Psychotherapien palliative behandelt werden (Chiò et al., 2012, Hanisch et al., 2015).

1.4.2 Zugelassene medikamentöse Therapien

Bis zum Jahr 2017 war Riluzol das einzig zugelassene Medikament mit dem eine moderate Krankheitsverzögerung mit lebensverlängernden Eigenschaften erreicht werden konnte (Bensimon et al., 1994, Miller et al., 2012, Cudkowicz et al., 2013). Riluzol hat neuroprotektive und antiglutamaterge Eigenschaften. Als Glutamat-Antagonist hemmt es den Untergang von Motoneuronen und verlängert somit die Überlebenszeit um durchschnittlich drei Monate (Bensimon et al., 1994). Riluzol hemmt spannungsabhängige Natriumkanäle, wodurch direkt ein unkontrollierter Einstrom von Natriumionen und indirekt die Aufnahme von Kalziumionen in das postsynaptische Neuron verhindert wird. Ansonsten würde der exzessive Einstrom von Natrium- und Kalziumionen die extrazelluläre Freisetzung von Glutamat in das präsynaptische Neuron fördern und im postsynaptischen Neuron zu exzitotoxischen Schädigungen und dem Zelltod führen (Urbani and Belluzzi, 2000). Riluzol wird oral verabreicht und bis zu 90 % der applizierten Dosis werden

resorbiert. Die absolute Bioverfügbarkeit von Riluzol liegt bei $60 \pm 18\%$ und die Eliminationshalbwertszeit beträgt 9 bis 15 Stunden (Groeneveld et al., 2001). Die primäre Metabolisierung von Riluzol zu dem aktiven Hauptmetaboliten N-Hydroxy-Riluzol passiert in der Leber über die Oxidation durch Cytochrom-P450-Isoenzym 1A2 (Martinet et al., 1997). N-Hydroxy-Riluzol wird zu Glukuronid konjugiert und hauptsächlich über den Urin ausgeschieden (Martinet et al., 1997). Die Wirkung von Riluzol ist bei Patienten mit Leberinsuffizienz beeinträchtigt, kann aber auch schon durch eine fettreiche Ernährung gestört werden, was zu einer verringerten Bioverfügbarkeit führt (Liboux et al., 1997).

Im Jahr 2017 wurde durch die Amerikanische Lebensmittel- und Arzneimittelbehörde (FDA; engl. *U.S. Food and Drug Administration*) ein weiteres Medikament namens Edaravon oder 3-Methyl-1-phenyl-5-pyrazolon zur Behandlung von ALS Patienten zugelassen (Rothstein, 2017). Edaravon wirkt als Radikalfänger (antioxidativ) und eliminiert z.B. Lipidperoxide, die durch die Reaktion freier Radikale mit Lipidstrukturen entstehen (Pérez-González and Galano, 2011). Eine gesteigerte Produktion an Lipidperoxide wird neben dem natürlichen Alterungsprozess mit verschiedenen Krankheiten assoziiert wie der ALS (Ferrante et al., 1997, Miana-Mena et al., 2011). Obwohl der genaue Wirkmechanismus bei der Behandlung von ALS nicht vollständig geklärt ist, wird die therapeutische Wirkung von Edaravon in ALS Patienten auf dessen antioxidative Eigenschaften zurückgeführt (Ohta et al., 2020). Die Behandlung mit Edaravon ist eine intravenöse Therapie. Daher wird bis heute intensiv an einer effektiven oralen Darreichungsform des Medikaments, gearbeitet (Takei et al., 2020). Sowohl Riluzol als auch Edaravon zeigen eine hohe Plasmaproteinbindung $> 90\%$ (Groeneveld et al., 2001, Tang et al., 2015). Die intravenöse Gabe von Edaravon führte in klinischen Studien eine Verlangsamung der Krankheitsprogression in ALS Patienten herbei, aber nur wenn bestimmte klinische Merkmale vorlagen, wie z.B. eine Erkrankungsdauer von weniger als zwei Jahren, gute Atemfunktionen und eine geringe bis mittlere Krankheitsprogression (Abe et al., 2017). Letztendlich zeigen beide Medikamente eine begrenzte Wirksamkeit. Zudem beruhen beide Therapieansätze auf der Beeinflussung des allgemeinen Krankheitsfortschritts der ALS. Deshalb besteht der Bedarf, dass weiter intensiv nach einem kurativ auf die Ursache der ALS wirkenden Medikament geforscht wird.

1.4.3 Antioxidative Therapiestrategie

Eine weitere Therapiestrategie ist der Einsatz von antioxidativ wirkenden Substanzen zum Schutz von Motoneuronen vor oxidativen Stress während der Krankheitsprogression (Louwerse et al., 1995, Andreassen et al., 2000, Petri et al., 2006, Szeto and Schiller, 2011, Carrera-Juliá et al., 2020). Die Therapie zielt darauf ab, die schädliche Wirkung freier Radikale zu reduzieren und somit die Folgeschädigungen durch den entstehenden

oxidativen Stress für die Zelle zu unterbinden, wodurch die Progression der ALS verlangsamt oder sogar gestoppt wird. Im Laufe der Jahre wurden viele Substanzen mit antioxidativer Wirkung gefunden und in zahlreichen *in vivo* Studien untersucht. Eine dieser Substanzen ist N-Acetyl-L-Cystein (ACC), das zur Synthese von Glutathion benötigt wird, dass als Radikalfänger fungiert (Kerksick and Willoughby, 2005). Glutathion besitzt eine antioxidative Wirkung im Organismus, spielt eine Rolle bei der Synthese des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat über die γ -Glutamyl-Transpeptidase und ist an der Energiegewinnung der Zellen beteiligt (Wu et al., 2004). Die Wirkung von Glutathion wird in Folge der ALS durch die gesteigerte Bildung freier Radikale und der mitochondrialen Dysfunktion erniedrigt, was zu einem erhöhten oxidativen Stress in der Zelle und zum Zelltode der Motoneuronen führt (Wu et al., 2004). Andererseits wird die Funktion von Glutathion durch eine gesteigerte Synthese des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat und der Aktivierung von Peroxidasen vermindert, was ebenso zum Zelltod der Motoneurone führt (Wu et al., 2004). Die Applikation von ACC führt zu einer gesteigerten Synthese von Glutathion und der Erniedrigung des induzierten oxidativen Stresses. Die orale Verabreichung von ACC hatte in behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse einen geringen Effekt auf die motorische Leistungsfähigkeit und die Überlebenszeit (Andreassen et al., 2000), zeigte aber keine Veränderung des Krankheitsverlaufs. Auch eine klinische Studie mit ALS Patienten spiegelt diese Ergebnisse wider (Louwerse et al., 1995).

Ein weiteres Antioxidans ist das zu den Szeto-Schiller (SS)-Peptiden gehörende SS-31 (Szeto and Schiller, 2011). Der Peptidwirkstoff SS-31 besteht aus der D-enantiomeren Aminosäure Arginin am N-Terminus, gefolgt von Dimethyltryptamin und den L-enantiomeren Aminosäuren Lysin und Phenylalanin (Szeto and Schiller, 2011). Dimethyltryptamin ist ein Tryptamin-Alkaloid mit antioxidativen Eigenschaften (Szeto, 2008). Durch die Reduktion von mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies wird der mitochondriale Permeabilitätsübergang und die Freisetzung von Cytochrom c gehemmt, wodurch der oxidativ induzierte Zelltod verhindert wird (Zhao et al., 2005). Die Behandlung von transgenen SOD1*G93A Mäusen mit SS-31 führte zu einer signifikanten Verzögerung des Krankheitsbeginns und einer Verlängerung der Überlebenszeit (Petri et al., 2006). In Stabilitätsversuchen in verschiedenen Medien (Plasma und Lebermikrosomen) von Maus, Ratte, Hund, Affe und Mensch wurde gezeigt, dass SS-31 zwischen zwei Stunden (Rattenplasma) und 30 Stunden (Humanplasma) stabil vorliegt (Szeto and Schiller, 2011). Pharmakokinetische Untersuchungen bewiesen, dass SS-31 innerhalb von acht Stunden fast vollständig abgebaut wird (Szeto and Schiller, 2011), wodurch es zu einer Limitierung der Wirksamkeit kommt.

1.4.4 Antiinflammatorische Therapiestrategien

Neuroinflammatorische Prozesse sind an der Entstehung und Progression der ALS beteiligt (Weydt and Möller, 2005, Philips and Robberecht, 2011). Daher sind Therapiestrategien mit einer neuroprotektiven Wirkung ein möglicher Ansatzpunkt. Die Behandlung mit dem antiinflammatorisch wirkenden Medikament Minocyclin war zuerst vielversprechend. In transgenen SOD1 Mäusen steigerte die Verabreichung von Minocyclin die Überlebensrate signifikant gegenüber nicht-behandelten Tieren (Kriz et al., 2002, Zhu et al., 2002). In einer Phase-III-Studie wurden ALS Patienten täglich mit Minocyclin oder einem Placebo behandelt und mittels der ALSFRS-R Skala bewertet (Gordon et al., 2007). Die Behandlung mit Minocyclin führte jedoch zu keiner gesteigerten Lebensqualität der Patienten gegenüber der Placebogruppe.

Ein anderer Ansatz ist die Inhibierung der Synthese von Prostaglandinen durch die Hemmung der Prostaglandinsynthesen oder Cyclooxygenasen (COX). Im lumbalen Rückenmark von ALS Patienten (Yasojima et al., 2001, Almer et al., 2002) und in transgenen SOD1*G93A Mäusen (Almer et al., 2001, Liang et al., 2008) wurde eine erhöhte Expression der COX nachgewiesen, sowie eine erhöhte Konzentration an Prostaglandinen in Gliazellen in sALS Patienten (Maihofner et al., 2002). Durch die Inhibierung der Prostaglandinsynthese konnte im transgenen SOD1*G93A Mausmodell die Gliazellaktivierung und die Degeneration der Motoneuronen im Rückenmark reduziert, der motorische Phänotyp gemildert und die Lebenszeit der Tiere verlängert werden (Drachman et al., 2002, Pompl et al., 2003, Azari et al., 2005). Dagegen zeigten *Almer et al.* (2006), dass die COX in transgenen SOD1*G93A Mäusen während der Krankheitsprogression eine untergeordnete Rolle aufweist und dass der Mangel an COX keinen Einfluss auf den Verlust an Motoneuronen und das Überleben der transgenen Tiere hat (Almer et al., 2006). Diese Ergebnisse lassen daran zweifeln, dass die COX die wichtigsten Enzyme für die Entstehung der ALS sind.

Ein anderer Wirkstoff, der ursprünglich in der Vorbeugung und Therapie als Antiallergikum Anwendung findet, ist Natriumcromoglicat (Howarth et al., 1985, Ratner et al., 2002). In Mausmodellen der Alzheimer'schen Krankheit hatte die Behandlung mit Natriumcromoglicat einen neuroprotektive Effekt, indem sie die Aktivierung der Mikroglia veränderte (Zhang et al., 2018). Die Behandlung transgener SOD1*G93A Mäuse mit Natriumcromoglicat führte zu einer verringerten Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen im lumbalen Rückenmark, sowie im Plasma (Granucci et al., 2019). Zudem zeigten behandelte im Vergleich zu nicht-behandelte Mäuse eine signifikant erhöhte Anzahl an Motoneuronen im lumbalen Rückenmark und eine deutliche

Verzögerung neurologischer Symptome, was in behandelten weiblichen Tieren zu einer verlängerten Überlebenszeit führte (Granucci et al., 2019). Ein Effekt auf die reduzierte Aktivierung von Gliazellen wie im Alzheimer Mausmodell, konnte in den behandelten SOD1*G93A Mäusen nicht nachgewiesen werden.

Neben synthetischen Substanzen werden auch natürliche Produkte in Betracht gezogen, einen kurativen Effekt in der ALS Therapie zu bewirken. Ein Beispiel ist der antioxidativ und antiinflammatorisch wirkende Kaffeesäure-Phenethyl-Ester (CAPE; engl. *caffeic acid phenethyl ester*) (Tolba et al., 2013, dos Santos et al., 2014), der u.a. im Propolis von Bienen vorkommt. Die tägliche orale Applikation von CAPE bewirkte in behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen eine signifikante Verzögerung des Krankheitsausbruchs und eine verlängerte Überlebenszeit gemessen an der nicht-behandelten, transgenen Gruppe (Fontanilla et al., 2012, Browne and Abbott, 2016). Zudem wurde eine verminderte Inflammation und Degeneration von Motoneuronen im lumbalen Rückenmark behandelter Mäusen beobachtet (Fontanilla et al., 2012). Trotz zahlreicher Publikationen über das therapeutische Potential bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen mit CAPE (Matteo and Esposito, 2003, Fontanilla et al., 2012, Konar et al., 2020), sind keine Daten aus klinischen Studien zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen an Menschen bekannt (Online Recherche: Google Scholar und Crossref, Datenbank: EU Clinical Trials Register und U.S. National Library of Medicine (ClinicalTrials.gov), verwendete Stichwörter: „caffeic acid phenethyl ester, human, clinical trial, propolis“ Stand: 21.03.2021).

1.4.5 Gentherapie

Neben einer antiinflammatorischen Therapiestrategie scheint die Gentherapie ein weiterer vielversprechender Ansatz gegen die ALS Krankheit zu sein. Hierbei wird zwischen der viralen Vektor Übertragung und der nicht-viralen Übertragung unterschieden (Nizzardo et al., 2012).

Die virale Vektor Übertragung beruht auf der Methodik, dass die verwendeten Gene, die z.B. für antiapoptotische Proteine oder auch neurotrophe Faktoren kodieren, mithilfe eines viralen Vektoren direkt in das zentrale Nervensystem oder in Muskeln appliziert werden (Colella et al., 2018). Die intramuskuläre Injektionen des antiapoptotisch wirkenden Bcl-2 Proteins oder der lentiviral markierten vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF; engl. *vascular endothelial growth factor*) führten im SOD1*G93A Mausmodell zu einer verlängerten Überlebenszeit, ohne toxische Nebenwirkungen zu verursachen (Azzouz et al., 2000, Azzouz et al., 2004).

In der nicht-viralen Übertragung werden modifizierte kurze RNA-Fragmente (siRNA; engl. *small interfering RNA*) oder Antisense-Oligonukleotide (ASO) verwendet, die sich nach der Übertragung mit einem komplementären Ribonukleinsäure-Molekül verbinden und dessen normale Funktion unterbinden (Klim et al., 2019). In transgenen SOD1*G93A Mäusen konnte die Genexpression des mutierten SOD1 Gens durch die Applikation von siRNA blockiert und die Degeneration von Motoneuronen reduziert werden (Ralph et al., 2005). Die Verwendung von ASO zur Gentherapie scheint ebenfalls vielversprechend. In verschiedenen Tierstudien und einer ersten klinischen Studie an ALS Patienten konnte durch den Einsatz von SOD1-ASO BII067 oder Tofersen der Abbau der SOD1 Messenger-RNA vermittelt werden und eine dosisabhängige Reduzierung des mutierten SOD1 Proteins im Liquor erreicht werden (Miller et al., 2013, McCampbell et al., 2018, Miller et al., 2020). Tofersen reduziert unselektiv die Expression des unter normalen physiologischen Bedingungen vorliegenden wildtypischen SOD1 Proteins, als auch der mutierten SOD1 Form. D.h. die Translation des mutierten SOD1 Proteins wird unterdrückt und dadurch der schadhafte Effekt der SOD1 Mutation im ALS Patienten reduziert. Die Behandlung von ALS Patienten mit Tofersen reduzierte signifikant die SOD1 Konzentration im Liquor und verlangsamte die Krankheitsprogression (Miller et al., 2020). Zudem wiesen die behandelten ALS Patienten einen Trend, hin zu einer Reduktion neuroinflammatorischer Reaktionen im Liquor auf.

1.4.6 Stammzellentherapie

Ein weiterer Ansatz in der ALS Forschung ist die Stammzellentherapie. Aufgrund der Multipotenz von Stammzellen ist diese Therapieoption in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der ALS Forschung gerückt. Die Idee dahinter ist, dass die degenerierenden Neurone ersetzt werden, indem transplantierte Stammzellen differenzieren und die Funktion übernehmen und es dadurch zu einer Verzögerung der Krankheitsprogression kommt. In verschiedenen Studien wurden Zelltypen wie embryonale, neurale, oder mesenchymale Stammzellen (MSC; engl. *mesenchymal stem cells*), sowie Knochenmarkszellen transplantiert (Thomsen et al., 2014). Die intravenöse Injektion humaner MSC in SOD1 Mäuse, führte zu einer erfolgreichen Differenzierung der Zellen im Gehirn und Rückenmark und einer signifikanten Verzögerung des Krankheitsbeginns und Progression des neurodegenerativen Phänotyps, sowie einer verlängerten Lebensdauer (Zhao et al., 2007, Vercelli et al., 2008, Uccelli et al., 2012). Außerdem konnte in SOD1 Mäusen eine Reduzierung der Astrogliose und Mikrogliose nach der Transplantation der humanen MSC beobachtet werden (Vercelli et al., 2008, Boido et al., 2014). Die Transplantation von MSC in ALS Patienten hatte keinen Einfluss auf die Progression der

Erkrankung (Mazzini et al., 2010, Mazzini et al., 2012). Trotz der zahlreichen Strategien und Studien, in denen therapeutische Erfolge in Tiermodellen verzeichnet werden konnten, zeigten viele Behandlungen bis heute nur limitierende Effekte in ALS Patienten.

1.4.7 Aminosäuren und Peptide als mögliche Wirkstoffe?

Peptide, die natürlicherweise hauptsächlich aus L-enantiomeren Aminosäureresten bestehen (Mahalakshmi and Balaram, 2007), besitzen in physiologischen Vorgängen eine hohe biologische Aktivität, Wirksamkeit und Spezifität für das Zielmolekül (Sun et al., 2012). Aufgrund dieser natürlichen Eigenschaften rückten Peptide als mögliche Wirkstoffe gegen Erkrankungen immer weiter in den Fokus der Forschung (Vlieghe et al., 2010, Craik et al., 2013), wie z.B. zur Behandlung und Modulierung der AD oder der ALS (Petri et al., 2006, Brasnjevic et al., 2009, Lee et al., 2009, Sun et al., 2012).

In transgenen SOD1*G93A Mäusen schützt die *ad libitum* Verabreichung von L-Arginin über das Trinkwasser die Motorneurone im lumbalen Rückenmark vor der Degeneration und verzögert den Krankheitsbeginn gegenüber nicht-behandelten, transgenen Tieren (Lee et al., 2009). Die Behandlung mit L-Arginin führt im transgenen SOD1*G93A Mausmodell in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Behandlungsstarts zu einer Verlängerung der Überlebenszeit um bis zu 20 % gegenüber nicht-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen (Lee et al., 2009). Dennoch konnte durch die frühzeitigere Verabreichung von L-Arginin vor dem Beginn der Neurodegeneration und dem Auftreten erster motorischer Defizite im SOD1*G93A Mausmodell, nur eine Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden und keine Heilung.

Im Fokus der Forschung sind außerdem Wirkstoffe, die aus L-enantiomeren Aminosäuren aufgebaut werden. Kreatin ist eine niedermolekulare Verbindung, die aus den L-enantiomeren Aminosäuren Arginin, Methionin und Glycin synthetisiert und unter normalen physiologischen Bedingungen vom menschlichen Körper u.a. in der Leber, Niere oder dem Gehirn produziert wird (Brosnan and Brosnan, 2007). Nach der Synthese wird Kreatin in Muskelzellen aufgenommen und ist dort am Muskelaufbau beteiligt (Greenhaff et al., 1994). Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Verabreichung mit Kreatin einen positiven Effekt auf die Überlebenszeit im ALS Tiermodell hatte (Klivenyi et al., 1999), starteten klinische Studien an ALS Patienten. Die zusätzliche Gabe von Kreatin hatte keine negativen Nebeneffekte auf den Gesundheitszustand der ALS Patienten, zeigte aber auch keinen statistisch positiven Effekt auf die motorischen Funktionen oder die Überlebenszeit behandelter ALS Patienten (Rosenfeld et al., 2008, Pastula et al., 2012). Das applizierte Kreatin wird, wie das eigensynthetisierte Kreatin, in Abhängigkeit von der applizierten Dosis

innerhalb von 30 Minuten bis 4 Stunden verstoffwechselt und abgebaut (Persky et al., 2003).

Trotz vieler Vorteile, z.B. einer hohen Spezifität und einer geringen Toxizität im Organismus, wird die Wirksamkeit der L-enantiomeren Aminosäuren und Peptide *in vivo* durch eine kurze Halbwertszeit aufgrund des schnellen Abbaus durch Proteasen limitiert (Miller et al., 1995, Chalifour et al., 2003, Jiang et al., 2015).

1.4.8 Warum nicht D-enantiomere Peptide als Medikamente nutzen?

1.4.8.1 Metabolismus und orale Bioverfügbarkeit von Peptiden

Im menschlichen Organismus werden beinahe alle Reaktionen über Peptide oder Proteine gesteuert. Peptide setzen sich aus mindestens zwei Aminosäureresten zusammen und sind i.d.R. linear angeordnet. Fast alle natürlich vorkommenden Aminosäuren liegen als L-Enantiomer in der Natur vor. Als Strukturelemente sorgen Peptide in Organismen für Stabilität, regeln als Biokatalysatoren enzymatische Reaktionen oder sind als Botenstoffe für die Übertragung von Signalen beteiligt z.B. von Nervenzelle zu Nervenzelle oder durch die BHS. Die Vorteile in der Nutzung von Peptiden als Wirkstoffe liegen in der geringeren Toxizität der Peptide bei gleichzeitig hoher Wirksamkeit und Spezifität für das Zielmolekül im Vergleich zu niedermolekularen Substanzen oder Biopharmazeutika (McGregor, 2008, Sun et al., 2012, Craik et al., 2013). Von Nachteil ist die schnelle Metabolisierung und z.T. geringe gastrointestinale Aufnahme, die zu einer limitierten Bioverfügbarkeit führen können (Adessi and Soto, 2002, Gomez-Orellana, 2005, Brown et al., 2020).

Üblicherweise findet die Applikation von Arzneimitteln in oraler Form z.B. von Tabletten statt. Die Verabreichung eines Peptidwirkstoffes *per oral* (p.o.) ist schwierig, da ein Großteil im Magen-Darm-Trakt verdaut wird (Hamman et al., 2005, Morishita and Peppas, 2006). Dadurch gelangt weniger Peptid in die Blutbahn und zum Zielorgan. Alternative Arzneimittelgaben, beispielsweise mittels intravenöser oder subkutaner Applikation, sind Möglichkeiten, den Magen-Darm-Trakt zu umgehen und den Wirkstoff direkt in die Blutbahn zu applizieren. Dennoch ist die orale Applikation zu bevorzugen, da diese Verabreichungsform den am wenigsten invasiven Weg bietet. In einer Langzeitanwendung ist sie für den Patienten und pflegende Angehörige am praktikabelsten und bringt daher die höchste Therapietreue mit sich. Vorteilhaft sind des Weiteren die geringeren Herstellungskosten, sowie die Flexibilität im Design der Dosierungsform und der Verpackungsart der Tabletten (Gomez-Orellana, 2005, Hassani et al., 2015).

1.4.8.2 D-enantiomere Peptide

Im Vergleich zu den meisten natürlich vorkommenden L-Peptiden und -verbindungen haben Peptide, die aus partiellen D-Aminosäuren-Substitutionen abgeleitet sind, oder D-Peptide, die vollständig aus D-enantiomeren Aminosäureresten aufgebaut sind, Vorteile gegenüber L-enantiomeren Peptiden. Aufgrund der stereoisomeren Selektivität von Proteasen sind D-enantiomere Peptide weniger anfällig für die Proteolyse, weshalb längere Halbwertszeiten und eine höhere Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe zu erwarten sind. Zudem sind D-Peptide wenig bis gar nicht immunogen (Sun et al., 2012).

Mittels Spiegelbild-Phagendisplay (Schumacher et al., 1996, Wiesehan and Willbold, 2003) wurden in unserem Institut in den letzten Jahren erfolgreich Peptide selektiert, die nur aus D-enantiomeren Aminosäureresten bestehen (Tab. 2) (Wiesehan et al., 2003, Olubiyi et al., 2014, Klein et al., 2016, Ziehm et al., 2016, Klein et al., 2017).

Tab. 2 Auflistung einiger selektierter D-enantiomerer Peptide und der L-enantiomeren Kontrollpeptide.

Der Buchstabe "c" vor dem Peptidnamen bedeutet, dass es sich um die zyklische Form des Peptids handelt, das ansonsten als lineares Peptid vorliegt.

D-Peptide	Sequenz der Aminosäurereste
D3	H-rprtrlhthnr-NH ₂
cD3r	rprrlhthnrr (N- zu C-terminale Verbindung)
RD2	H-ptlhthnrrrr-NH ₂
Tandem D-Peptide	Sequenz der Aminosäurereste
D3D3	H-rprtrlhthnrrprtrlhthnr-NH ₂
RD2D3	H-ptlhthnrrrrprtrlhthnr-NH ₂
RD2D2	H-ptlhthnrrrrptlhthnrrrr-NH ₂
cRD2D3	ptlhthnrrrrprtrlhthnr (N- zu C-terminale Verbindung)
L-Peptide	Sequenz der Aminosäurereste
L-D3	H-RPRTLHTHRNR-NH ₂
L-RD2	H-RPRTLHTHRNR-NH ₂

Die vorrangig für die kausale Therapie der AD selektierten D-Peptide bestehen aus 12 linear oder zyklisch angeordneten D-enantiomeren Aminosäureresten (Tab. 2). Weitere Peptide sind die sogenannten Tandemvarianten vom D3 und RD2 (Tab. 2). Das Tandem-D-Peptid D3D3 ist ein linear verknüpftes Dimer des D3, während das Tandem-D-Peptid RD2RD2 ein

linear verknüpftes Dimer von RD2 ist und es sich bei RD2D3 um ein linear verknüpftes Kombinationsdimer aus D3 und RD2 handelt. Die Tandem-D-Peptide bestehen aus 24 Aminosäureresten und sind entweder linear oder zyklisch angeordnet.

In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien wurde gezeigt, dass die D-Peptide gegenüber den L-Peptiden diverse Vorteile aufweisen. In Stabilitätstests wurde gezeigt, dass die D-Peptide eine hohe proteolytische Stabilität besitzen, sowohl in verschiedenen humanen Medien (Lebermikrosomen, Plasma und simulierter Magen- und Darmsaft), als auch in Organhomogenat von Mäusen (Elfgen et al., 2017, Elfgen et al., 2019). Zudem konnte in pharmakokinetischen Untersuchungen im C57BL/6 Mausmodell eine hohe orale Bioverfügbarkeit und lange terminale Halbwertszeiten gezeigt werden (Jiang et al., 2015, Leithold et al., 2016b, Schartmann et al., 2018a). Des Weiteren wurde die Überwindung der BHS nachgewiesen (Liu et al., 2010, Schartmann et al., 2018b). Sowohl *in vitro*, als auch in verschiedenen *in vivo* Behandlungsstudien an Mausmodellen der AD zeigte das D-enantiomere Peptid RD2 eine überragend hohe Effizienz (Kutzsche et al., 2017, van Groen et al., 2017, Schemmert et al., 2019b, Schemmert et al., 2019a). RD2 bindet bevorzugt an Amyloid β (A β) Monomere mit nanomolarer Affinität und stabilisiert damit A β in seiner nativen Konformation (Zhang et al., 2019), welches die Auflösung der toxisch wirkenden A β -Oligomere bedingt (Willbold and Kutzsche, 2019). Nachdem die präklinische Wirksamkeit für RD2 in mehreren Mausmodellen der AD gezeigt werden konnte, wurde RD2 für klinische Studien zugelassen und erfolgreich in zwei klinischen Phase-I-Studien an gesunden Probanden getestet (Kutzsche et al., 2020).

Wie oben zuvor beschrieben, wurde mittels rationalem Design RD2RD2, die Tandem-D-Peptidvariante von RD2 entwickelt, um die Effizienz von RD2 in Bezug auf seine Avidität und Affinität auf A β -Monomere noch zu verbessern. Trotz viel versprechender *in vitro* Ergebnisse einer durch RD2RD2 signifikant reduzierten A β -induzierten Zelltoxizität (Kutzsche et al., 2017), zeigte die *in vivo* Behandlung mit RD2RD2 zwar keinen Einfluss auf die Kognition behandelter AD Mäuse, aber einen antiinflammatorischen Effekt nach intraperitonealer Gabe (Manuskript Kapitel 3.1).

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war zum einen die Charakterisierung des SOD1*G93A Mausmodells und zum anderen die präklinische Untersuchung der potentiell antiinflammatorischen Wirkung des D-enantiomeren Peptids RD2RD2 in den transgenen SOD1*G93A Mäusen. Im Mittelpunkt standen dabei spezifische Analysen zum Verhalten und der Motorik der Tiere, sowie die Ermittlung des Körpergewichts und des Gewichts des Zwillingswadenmuskels. Immunhistochemische Analysen neuroinflammatorischer Marker (Astrozyten und Mikroglia) im Hirn und Rückenmark, sowie die biochemische Analyse von Zytokinen in Plasmaproben behandelter und nicht-behandelter Tiere sollten zusätzliche Daten zur potentiell antiinflammatorischen Wirkung von RD2RD2 liefern. Die Behandlung mit RD2RD2 hatte zum Ziel, zu untersuchen, ob es einen antiinflammatorischen Effekt auf Mediatoren der Neuroinflammation während der phänotypischen Progression der Erkrankung gibt und sich dies positiv auf das Überleben und die Lebensqualität behandelter SOD1*G93A Mäuse auswirkt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Teilstudien mit folgenden Zielen durchgeführt:

(1) Studie zur Charakterisierung des neurodegenerativen Phänotyps des transgenen SOD1*G93A Mausmodells (Kapitel 4.2)

- In dieser ersten Studie wurde der spezifische Phänotyp transgener SOD1*G93A Mäusen während der Krankheitsprogression in verschiedenen Verhaltens- und motorischen Tests untersucht (Kapitel 4.2.1).
- Zusätzlich wurde das Körpergewicht der Tiere analysiert, sowie eine Magnetresonanztomographie vom Zwillingswadenmuskel aufgenommen. Zur Kontrollgruppe dienten gleichaltrige nicht-transgenen Geschwistertieren (Kapitel 4.2.1).

(2) Präventive Therapiestudien (Kapitel 3)

- Die erste präventive Therapiestudie (intraperitoneale Behandlung über vier Wochen) diente dazu herauszufinden, ob die Behandlung mit RD2RD2 einen generellen therapeutischen Effekt auf den neurodegenerativen Phänotyp und die inflammatorischen Prozesse im SOD1*G93A Mausmodell hat (Kapitel 3.1).

- In der zweiten Therapiestudie (orale Behandlung über neun Wochen) wurde untersucht, ob RD2RD2 auch nach oraler Applikation therapeutisches Potential besitzt (Kapitel 3.2).
- Des Weiteren wurde der Behandlungseffekt nach den Therapiestudien durch immunhistochemische und biochemische Analysen von Gewebe und Plasma validiert.

(3) Überlebensstudie (Kapitel 4.2)

- In dieser Studie sollte untersucht werden, ob die orale Behandlung mit RD2RD2 einen Einfluss auf das Überleben der ALS Mäuse hat (Kapitel 4.2.2).
- Zusätzlich wurde überprüft, ob die Behandlung mit RD2RD2 unerwünschte Nebenwirkungen ausweist. Hierfür wurde eine Gruppe von nicht-transgenen (gesunden) Mäusen mit derselben Dosis RD2RD2 behandelt wie die transgenen Geschwistertiere.

3 Manuskripte

3.1 A novel anti-inflammatory D-peptide inhibits disease phenotype progression in an ALS mouse model

Autoren: Post J, Kogel V, Schaffrath A, Lohmann P, Shah NJ, Langen K-J, Willuweit A, Willbold D and Kutzsche J

Journal: Molecules
Special Issue: Recent Advances in CNS Drug Discovery
Veröffentlicht am 13. März 2021

DOI: 10.3390/molecules26061590

Impact Factor: 3.267 (2019)

Beitrag: Planung der ALS-Studie
Durchführung aller Verhaltensversuche (ALS) (Körpergewicht, SHIRPA-Test, modifizierter Stabtest, Krankheitsprogression)
Operation/Behandlung der ALS-Mäuse
Durchführung der immunhistologischen Experimente (ALS) (Mikrogliazellen und Neurone im Gehirn und Rückenmark)
Quantifizierung der immunhistologischen Ergebnisse (ALS)
Auswertung der biochemischen Analyse (AD)
Anfertigung aller Abbildungen (ALS und AD)
Analyse und statistische Auswertung aller Daten (ALS und AD)
Hauptverfassung und Prüfung des Manuskriptes

Article

A Novel Anti-Inflammatory D-Peptide Inhibits Disease Phenotype Progression in an ALS Mouse Model

Julia Post ¹, Vanessa Kogel ¹, Anja Schaffrath ¹, Philipp Lohmann ², Nadim Joni Shah ^{2,3,4,5}, Karl-Josef Langen ^{2,6}, Dieter Willbold ^{1,7,*}, Antje Willuweit ^{2,*} and Janine Kutzsche ^{1,*}

- ¹ Institute of Biological Information Processing, Structural Biochemistry, IBI-7, Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Jülich, Germany; j.post@fz-juelich.de (J.P.); vkogel@ukaachen.de (V.K.); a.schaffrath@fz-juelich.de (A.S.)
 - ² Institute of Neuroscience and Medicine 4, INM-4, Medical Imaging Physics, Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Jülich, Germany; p.lohmann@fz-juelich.de (P.L.); n.j.shah@fz-juelich.de (N.J.S.); k.j.langen@fz-juelich.de (K.-J.L.)
 - ³ Institute of Neuroscience and Medicine 11, INM-11, JARA, Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Jülich, Germany
 - ⁴ JARA-Brain-Translational Medicine, 52074 Aachen, Germany
 - ⁵ Department of Neurology, RWTH Aachen University, 52062 Aachen, Germany
 - ⁶ Department of Nuclear Medicine, RWTH Aachen University, 52062 Aachen, Germany
 - ⁷ Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany
- * Correspondence: d.willbold@fz-juelich.de (D.W.); a.willuweit@fz-juelich.de (A.W.); j.kutzsche@fz-juelich.de (J.K.); Tel.: +49-2461-619496 (J.K.)



Citation: Post, J.; Kogel, V.; Schaffrath, A.; Lohmann, P.; Shah, N.J.; Langen, K.-J.; Willbold, D.; Willuweit, A.; Kutzsche, J. A Novel Anti-Inflammatory D-Peptide Inhibits Disease Phenotype Progression in an ALS Mouse Model. *Molecules* **2021**, *26*, 1590. <https://doi.org/10.3390/molecules26061590>

Academic Editor: Fernanda Borges

Received: 22 January 2021

Accepted: 11 March 2021

Published: 13 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease characterised by selective neuronal death in the brain stem and spinal cord. The cause is unknown, but an increasing amount of evidence has firmly certified that neuroinflammation plays a key role in ALS pathogenesis. Neuroinflammation is a pathological hallmark of several neurodegenerative disorders and has been implicated as driver of disease progression. Here, we describe a treatment study demonstrating the therapeutic potential of a tandem version of the well-known all-D-peptide RD2 (RD2RD2) in a transgenic mouse model of ALS (SOD1*G93A). Mice were treated intraperitoneally for four weeks with RD2RD2 vs. placebo. SOD1*G93A mice were tested longitudinally during treatment in various behavioural and motor coordination tests. Brain and spinal cord samples were investigated immunohistochemically for gliosis and neurodegeneration. RD2RD2 treatment in SOD1*G93A mice resulted not only in a reduction of activated astrocytes and microglia in both the brain stem and lumbar spinal cord, but also in a rescue of neurons in the motor cortex. RD2RD2 treatment was able to slow progression of the disease phenotype, especially the motor deficits, to an extent that during the four weeks treatment duration, no significant progression was observed in any of the motor experiments. Based on the presented results, we conclude that RD2RD2 is a potential therapeutic candidate against ALS.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis; behaviour; D-enantiomeric peptide; neuroinflammation; SOD1*G93A mice

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD), Parkinson's diseases (PD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) are among the most common neurodegenerative diseases in adults. In addition to cognitive impairment, selective neuronal death and neuroinflammation in the central nervous system are prominent pathologic features in AD [1–4]. Clinically, ALS manifests as focal muscular weakness, with atrophy of skeletal muscles up to progressive paralysis and premature death, usually from respiratory failure [5]. Most ALS cases are sporadic (sALS), while a minority are familial cases (fALS) and caused by inherited mutations [6].

A key discovery was the identification of a mutation in the gene of the enzyme superoxide dismutase 1 (SOD1), which is causative in up to 20% of all fALS and in up to 3% of sALS cases [7,8]. To investigate the pathophysiology of ALS and the role of mutated SOD1 in disease development and progression of ALS, a transgenic mouse model was created (tg(SOD1*G93A)1Gur), which expresses mutant SOD1 (SOD1*G93A) and develops adult-onset neurodegeneration of neurons in the lumbar spinal cord and motor cortex and progressive motor deficits, which leads to paralysis [9–12]. Due to similar clinical features and pathology to human ALS, these mice have been studied extensively over years and are still a cornerstone of preclinical ALS research [13]. In addition to the clinical symptoms, neuroinflammation and immune-inflammatory processes are further prominent pathological hallmarks of human ALS cases and the transgenic SOD1*G93A mice [14–16]. Neuroinflammation is characterised by the presence of activated glial cells, mainly microglia and astrocytes. In addition, previous studies demonstrated that activated astrocytes and microglia play a role in disease progression of ALS [17,18]. Cytokines, the primary messengers of inflammatory processes, are released by microglia and astrocytes in response to neuroinflammation [19–21]. They can be classified into two different types: type 1 cytokines (= pro-inflammatory) increase the inflammatory reaction, while type 2 cytokines (= anti-inflammatory) decrease the inflammatory reaction. In a non-pathological state, a complex signalling cascade produces a protective immune response through cytokines [22,23]. A temporal increased level of inflammatory cytokines was observed in ALS, but also in AD [24–26]. Like many other neurodegenerative diseases, such as AD, to date there is no curative therapy for ALS. Thus far, only symptomatic and minor life-prolonging treatments are available [27–29].

Recently, we described the development of compounds for a disease-modifying treatment of AD. The compound RD2 preferentially binds amyloid beta (A β) monomers with nanomolar affinity and stabilises A β in its native conformation [30], which is a novel strategy to directly disassemble toxic A β oligomers into native monomers [31]. RD2 has recently successfully passed a phase I clinical trial in healthy subjects (Single Ascending Doses (SAD) EUDRA-CT: 2017-000396-93 and Multiple Ascending Doses (MAD) EUDRA-CT: 2018-002500-14) [32] after demonstrating its preclinical efficacy in several AD mouse models [33–36]. The head-to-tail tandem version of RD2, RD2RD2, was originally designed to obtain a bivalent version of RD2 with potentially higher avidity and affinity for polyvalent A β assemblies. Like RD2, also RD2RD2 belongs to a relatively new class of drugs, the all-D-peptides, which consist solely of D-enantiomeric amino acid residues and which exhibit several advantages including high proteolytic stability and low immunogenicity [37,38].

Here, we explored the therapeutic potential of RD2RD2 in the ALS SOD1*G93A transgenic mouse model. For this purpose, we treated SOD1*G93A transgenic mice intraperitoneally for four weeks with RD2RD2 vs. placebo and performed longitudinally various behavioural and motor coordination tests. Subsequently, the brain stem and lumbar spinal cord of treated mice were immunohistochemically investigated.

2. Results

Earlier, we tested the efficacy of RD2RD2 in an AD specific mouse model overexpressing a double mutation of amyloid precursor protein and presenilin 1 (APP/PS1) by intraperitoneal treatment for four weeks with either RD2RD2 or placebo. Treatment with RD2RD2 had a strong effect on neuroinflammation as it significantly reduced the number of activated microglia in both cortex and hippocampus down to levels of non-transgenic mice (ntg) (Figure S1a, e–g and b, h–j and Table S1). In addition, RD2RD2-treated mice displayed significantly reduced astrogliosis (antibody glial fibrillary acidic protein (GFAP)) in the cortex and hippocampus (Figure S1c, k–m and d, n–p and Table S1). Additionally, analysis of the inflammatory marker levels revealed a remarkable and significant decrease in the levels of all cytokines measured in RD2RD2-treated APP/PS1 mice in comparison to the placebo group (Figure S2a–g and Table S2).

Encouraged by the strong effect of RD2RD2 on neuroinflammation in treated APP/PS1 mice, we performed a treatment study using the transgenic ALS mouse model SOD1*G93A, a model in which neuroinflammation has been described to drive disease progression [18,19].

2.1. RD2RD2 Treatment Prevented Further Motor Phenotype Progression in SOD1*G93A Mice

Twelve weeks old female SOD1*G93A mice were treated with placebo ($n = 10$) or 19 mg/kg/d RD2RD2 ($n = 12$) and the non-transgenic littermates were treated with placebo ($n = 14$) formulated in an intraperitoneal (i.p.) osmotic minipump for 28 days. After a small weight loss post-operatively, all mice gained weight continuously over the four weeks treatment period. Throughout the whole testing period the average body weight was significantly different between non-transgenic and transgenic mice (Figure 1a; RD2RD2: 18.8 ± 0.2 g, placebo: 19.0 ± 0.2 g vs. ntg: 20.3 ± 0.3 g; two-way repeated measurement (RM) analysis of variance (ANOVA), $F(2,128) = 7.87$, $p = 0.002$, Fisher's least significant difference (LSD) post hoc analysis, ntg vs. RD2RD2 $p < 0.001$ and ntg vs. placebo $p = 0.006$). RD2RD2 treatment neither influenced the average body weight nor body weight gain.

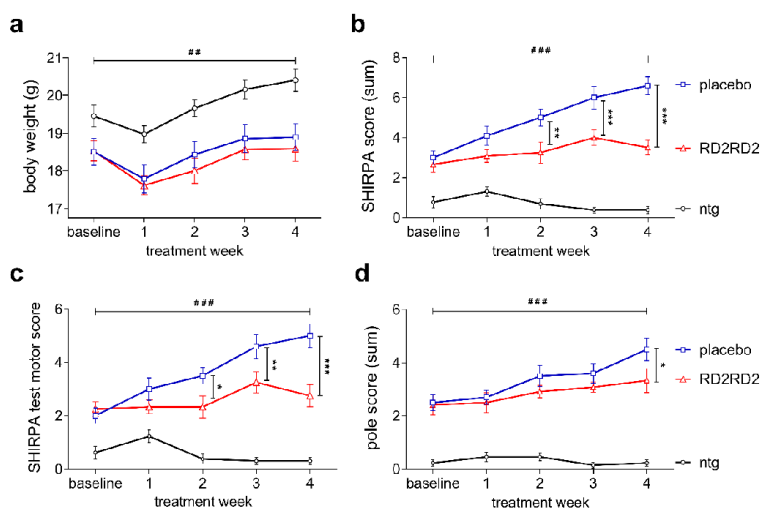


Figure 1. RD2RD2 treatment prevented further significant progression of motor phenotype in SOD1*G93A mice. Changes in absolute body weight (g) over time during treatment revealed significant differences between transgenic and non-transgenic mice (a). Analysis of the SHIRPA test battery to evaluate the phenotypic development of RD2RD2- and placebo-treated SOD1*G93A mice resulted in halt of phenotype progression upon treatment (b). Subdivision of the SHIRPA parameters into a motor score revealed significant inhibition of motor symptom progression in RD2RD2- vs. placebo-treated SOD1*G93A (c). Pole test analysis (d) resulted in significant conservation of motor skills in RD2RD2-treated mice, whereas the motor deficits progressed further in placebo-treated mice. All non-transgenic mice exhibited normal motor function throughout the experimental period. Data is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were conducted by two-way RM ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis, non-transgenic mice (ntg) $n = 13$, RD2RD2 $n = 12$ and placebo $n = 10$ for each test. Lozenges and asterisks (*) indicate a significance between treatment groups (ntg vs. RD2RD2 or ntg vs. placebo: ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ and RD2RD2 vs. placebo: * $p = 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

The SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment (SHIRPA test battery) was used to monitor the progression of the neurodegenerative phenotype of transgenic placebo- or RD2RD2-treated mice [39,40]. At

baseline and during treatment, both transgenic groups showed behavioural and motor impairments compared to their non-transgenic littermates (Figure 1b; two-way RM ANOVA, $F(2,128) = 101.06$, $p < 0.001$, Fisher's LSD post hoc analysis, ntg vs. RD2RD2 $p < 0.001$ and ntg vs. placebo $p < 0.001$). Already after two weeks of treatment, the difference in SHIRPA score was statistically significant between the RD2RD2 group and placebo-treated SOD1*G93A mice (Figure 1b; RD2RD2 vs. placebo $p < 0.001$).

The subdivision of the SHIRPA parameters into a motor score revealed further specific details about progression of motor deficits of placebo- but not RD2RD2-treated mice (Figure 1c). At the end of the treatment period, motor deficits were significantly lower upon RD2RD2 treatment in comparison to placebo-treated SOD1*G93A mice (Figure 1c; motor score, two-way RM ANOVA, $F(2,128) = 66.77$, $p < 0.001$, Fisher's LSD post hoc analysis, placebo vs. ntg $p < 0.001$ and placebo vs. RD2RD2 $p < 0.001$).

Additional investigations on the motor performance of RD2RD2-treated SOD1*G93A mice were performed with the pole test (Figure 1d). This test indicates functional deficits in motor coordination and muscular strength of SOD1*G93A mice. Throughout the experiment, non-transgenic mice did not show any motor deficits, while transgenic SOD1*G93A mice displayed already a significantly higher pole score at baseline (Figure 1d; two-way RM ANOVA, $F(2,128) = 104.95$, $p < 0.001$, Fisher's LSD post hoc analysis, ntg vs. RD2RD2 $p < 0.001$ and ntg vs. placebo $p < 0.001$). There was a slight but significant progression in the motor deficit of the placebo group, while the RD2RD2-treated SOD1*G93A mice kept their motor skills at a constant level (Figure 1d; two-way RM ANOVA, $F(1,80) = 0.85$, $p = 0.05$, Fisher's LSD post hoc analysis, RD2RD2 vs. placebo (treatment week 4) $p = 0.021$).

Assessment of disease onset was measured by the score of Mead et al., 2011 [41]. Treatment delayed symptom onset in RD2RD2- vs. placebo-treated SOD1*G93A mice, however Kaplan–Meier analysis did not reveal a significant difference in disease onset (Figure 2; average disease onset: RD2RD2 104 days and placebo 101.5 days). Within the non-transgenic mice, there was no detectable absence of hind limb splay or tremor during the study.

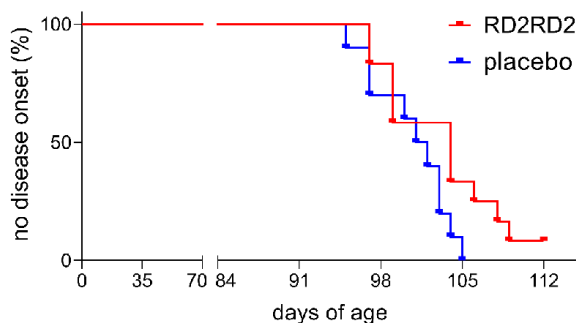


Figure 2. RD2RD2 administration resulted in a non-significant shift of disease onset of SOD1*G93A mice. Assessment of disease was performed three times a week from the start of the experiment. Disease onset is defined as first defects detectable in hind limb splay and an increasing tremor. RD2RD2-treated SOD1*G93A mice had a delayed onset of disease symptoms vs. placebo group. One treated mouse did not develop a tremor in hind limbs until the end of the experiment. Statistical calculations were conducted by Kaplan–Meier survival analysis and the log-rank analysis, RD2RD2 $n = 12$ and placebo $n = 10$.

2.2. RD2RD2 Treatment Led to Reduction of Activated Glia Cells and Restored Neuron Density in SOD1*G93A Mice

To support the findings of the SHIRPA and pole test of RD2RD2-treated SOD1*G93A mice, we analysed activation of inflammatory cells in the brain stem, as well as neuronal nuclei in the motor cortex of all mice. Moreover, we analysed sections of the lumbar spinal

cord, since motor weakness is first detectable in the hind limbs in this mouse model and the motoric pathways are linked through the lumbar spinal cord to the brain. For pathological analysis, levels of activated glia cells (using an antibody against integrin α -M/ β -2 (CD11b) labelling activated microglia in general, and an antibody against GFAP labelling activated astrocytes) and the number of neurons (using an antibody against neuronal nuclear proteins (NeuN)) were determined by immunohistochemical staining and quantified. Immunolabelling revealed a significantly decreased number of activated microglia in the brain stem of RD2RD2- vs. placebo-treated SOD1*G93A mice (Figure 3a,e–g and Table 1). In lumbar spinal cord sections from RD2RD2-treated SOD1*G93A mice, activated microglia also showed a decrease which did not reach statistical significance towards placebo-treated animals (Figure 3b,h–j and Table 1). Additionally, we analysed activated astrocytes. There was a significant difference in the number of activated astrocytes in the brain stem between all three treatment groups after 28 days of treatment (Figure 3c,k–m and Table 1). RD2RD2 treatment was able to reduce also the number of activated astrocytes significantly in comparison to the placebo group. More important, analysis of activated astrocytes within the lumbar spinal cord revealed a significant decrease in the RD2RD2-treated SOD1*G93A mice down to levels which are not significant to non-transgenic littermates (Figure 3d,n–p and Table 1).

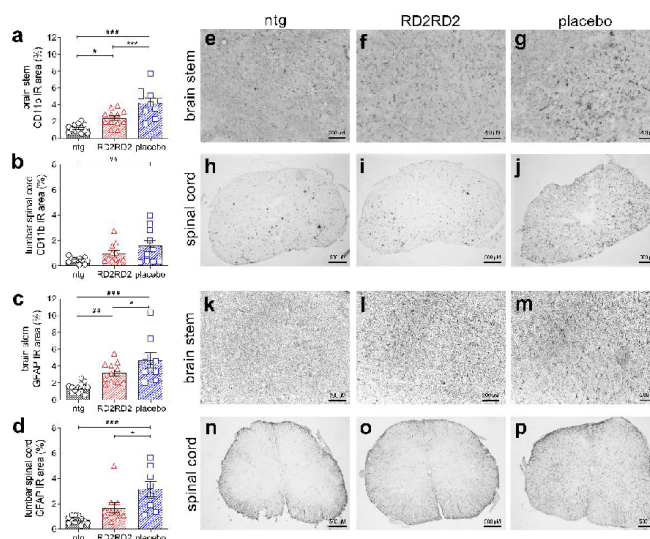


Figure 3. Immunohistochemical investigations revealed a reduction of neuroinflammation in RD2RD2-treated SOD1*G93A mice. Analysis of activated microglia and astrocytes in brain stem and lumbar spinal cord showed significant reduction of neuroinflammation (staining with CD11b and GFAP antibodies with subsequent quantification of glia cells). Presentation of the analysed cells, brain and lumbar spinal cord are given on the right (microglia: a,e–g = brain stem and b,h–j = lumbar spinal cord; astrocytes: c,k–m = brain stem and d,n–p = lumbar spinal cord). Data is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were conducted by one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis, CD11b: ntg $n = 13$, RD2RD2 $n = 12$, placebo $n = 10$ (brain stem) and ntg $n = 11$, RD2RD2 $n = 11$, placebo $n = 10$ (lumbar spinal cord) and GFAP: ntg $n = 13$, RD2RD2 $n = 11$, placebo $n = 9$ (brain stem) and ntg $n = 12$, RD2RD2 $n = 10$, placebo $n = 8$ (lumbar spinal cord). Lozenges (#) and asterisks (*) indicate a significance between treatment groups (ntg vs. RD2RD2 or ntg vs. placebo: # $p = 0.05$, ## $p = 0.01$, ### $p < 0.001$ and RD2RD2 vs. placebo: * $p = 0.05$, ** $p < 0.001$). IR: immunoreactivity. Circles: placebo-treated ntg; triangles: RD2RD2-treated SOD1*G93A mice and squares: placebo-treated SOD1*G93A mice.

Table 1. Evaluation of immunolabelling in brain and lumbar spinal cord of SOD1*G93A mice revealed a decrease of gliosis after treatment with RD2RD2. Data is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were conducted by one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis. Lozenges ([#]) and asterisks (*) indicate a significance between treatment groups (ntg vs. RD2RD2 or ntg vs. placebo: [#] $p = 0.05$, ^{##} $p = 0.01$, ^{###} $p < 0.001$ and RD2RD2 vs. placebo: * $p = 0.05$, *** $p < 0.001$).

IR ¹	Area	ntg	RD2RD2	Placebo	Statistic (One-Way ANOVA Analysis of Variance)
CD11b (%)	brain stem	1.21 $\pm$ 0.13	2.41 $\pm$ 0.28 ^{#, ***}	4.29 $\pm$ 0.54 ^{###}	F(2,32) = 22.02, $p < 0.001$ ntg vs. RD2RD2 $p = 0.011$ ntg vs. placebo $p < 0.001$ RD2RD2 vs. placebo $p < 0.001$
	lumbar spinal cord	0.46 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.23	1.57 $\pm$ 0.44 ^{##}	F(2,29) = 3.96, $p = 0.030$ ntg vs. RD2RD2 $p = 0.175$ (ns) ntg vs. placebo $p = 0.009$ RD2RD2 vs placebo $p = 0.156$ (ns)
GFAP (%)	brain stem	1.43 $\pm$ 0.16	3.23 $\pm$ 0.37 ^{##, *}	4.68 $\pm$ 0.88 ^{###}	F(2,30) = 11.62, $p < 0.001$ ntg vs. RD2RD2 $p = 0.009$ ntg vs. placebo $p < 0.001$ RD2RD2 vs. placebo $p = 0.049$
	lumbar spinal cord	0.73 $\pm$ 0.08	1.69 $\pm$ 0.4 [*]	3.16 $\pm$ 0.6 ^{###}	F(2,27) = 10.93, $p < 0.001$ ntg vs. RD2RD2 $p = 0.060$ (ns) ntg vs. placebo $p < 0.001$ RD2RD2 vs. placebo $p = 0.011$
NeuN (counts)	brain stem	450 $\pm$ 42.3	406 $\pm$ 31.8 ^{##, *}	343 $\pm$ 46.4 ^{###}	F(2,27) = 1.66, $p = 0.208$ ntg vs. RD2RD2 $p = 0.002$ ntg vs. placebo $p < 0.001$ RD2RD2 vs. placebo $p = 0.021$
	motor cortex	947 $\pm$ 42.8	924 $\pm$ 32.9 [*]	784 $\pm$ 42.6 ^{##}	F(2,27) = 4.92, $p = 0.015$ ntg vs. RD2RD2 $p = 0.677$ (ns) ntg vs. placebo $p = 0.007$ RD2RD2 vs. placebo $p = 0.020$

¹ IR: immunoreactivity.

Moreover, we analysed the number of neurons in SOD1*G93A mice in the brain stem and motor cortex (Figure 4a,b, and Table 1). Quantification of NeuN-positive cells revealed a loss of neurons in transgenic SOD1*G93A mice vs. non-transgenic littermates in both regions. Treatment with RD2RD2 significantly rescued neurons in the motor cortex to levels of non-transgenic littermates. The number of neurons in the brain stem showed the same, but non-significant, tendency (Table 1).

Immunohistochemical staining of neurons was also performed for the lumbar spinal cord, but due to a sub-optimal staining protocol, the neuronal count could not be quantified.

At the end of the study, muscles were harvested along with brain and spinal cord tissues. We investigated the *M. gastrocnemius* of the hind limbs of all mice to determine a potential treatment effect on muscle degeneration (Figure 5). Analysis of the muscle revealed a significant difference between non-transgenic and transgenic mice, but not between treatment groups (Figure 5a). Further, muscle degeneration of the *M. gastrocnemius* was visualised by haematoxylin and eosin (H&E) staining. Myofibrils of the non-transgenic mice were rectangular and regularly shaped, while first irregularly-shaped structures of myofibrils of both transgenic groups were detectable (Figure 5b).

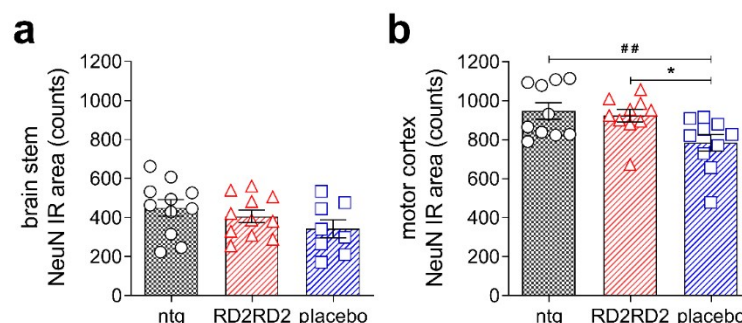


Figure 4. Treatment with RD2RD2 rescued significantly neurons in the motor cortex of SOD1*G93A mice. Analysis of neurons in the brain stem (a) and motor cortex (b) revealed a significant loss in placebo-treated SOD1*G93A mice, while the count of neurons in RD2RD2-treated mice was similar to the count of non-transgenic mice. Data is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were conducted by one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis, ntg $n = 11$, RD2RD2 $n = 11$, placebo $n = 8$ (brain stem) and ntg $n = 10$, RD2RD2 $n = 10$, placebo $n = 10$ (motor cortex). Lozenges and asterisks (*) indicate a significance between treatment groups (ntg vs. RD2RD2 or ntg vs. placebo: ## $p = 0.01$ and RD2RD2 vs. placebo: * $p = 0.05$). IR: immunoreactivity. Circles: placebo-treated ntg; triangles: RD2RD2-treated SOD1*G93A mice and squares: placebo-treated SOD1*G93A mice.

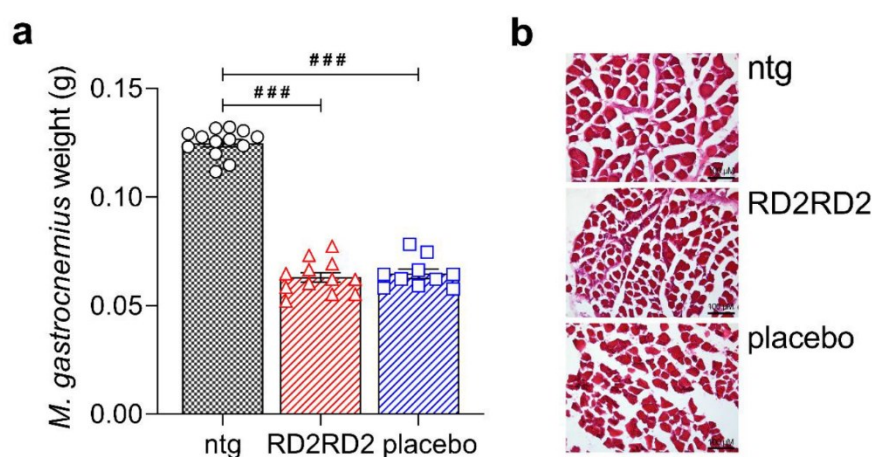


Figure 5. Analysis of the *M. gastrocnemius* in SOD1*G93A mice. Weighing of the *M. gastrocnemius* of both hind limbs revealed a significant difference between non-transgenic and transgenic mice, but not between treatment groups (a). A first staining of muscle slices was conducted with haematoxylin and eosin (H&E) to assess muscle degeneration (b). Data is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were conducted by one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis, ntg $n = 13$, RD2RD2 $n = 12$ and placebo $n = 10$. Lozenges indicate a significance between treatment groups (ntg vs. RD2RD2 or ntg vs. placebo: ### $p < 0.001$). Circles: placebo-treated ntg; triangles: RD2RD2-treated SOD1*G93A mice and squares: placebo-treated SOD1*G93A mice.

3. Discussion

ALS and AD are both fatal neurodegenerative diseases affecting the central nervous system. Despite intensive research, current treatment options are only symptomatic [29,42]. Neuroinflammation plays a major role in both diseases, increasing evidence has firmly certi-

fied that neuroinflammation induced by SOD1 plays a key role in ALS pathogenesis [14,25], as well as induced by A β in the pathogenic process in AD [43,44].

Based on promising anti-inflammatory effects in an earlier study with AD mice (fully reported in the Supplementary Materials), we examined the compound RD2RD2 for its efficacy in the treatment in a mouse model of a neurodegenerative disorder in which neuroinflammation is known as the main driver of disease. Therefore, the SOD1*G93A ALS mouse model on a C57Bl/6 genetic background was chosen [17,18,26,45]. These mice exhibit the first measurable deficits in motoric performance at age 8.5 weeks [41], which is by definition within the pre-symptomatic phase [46]. Using the SHIRPA test battery, we were able to confirm these early motor deficits of the mouse line in house (Figure S3). Disease onset, defined as the first signs of tremor and hind limb splay defects, started in our colony at an average of week 14 (Figure 2). At the age of 12 weeks, intraperitoneal treatment with RD2RD2 or placebo was initiated in SOD1*G93A mice, which is approximately two weeks before disease onset. RD2RD2 treatment of SOD1*G93A mice significantly slowed their phenotype progression, as measured using the SHIRPA test battery, in comparison to placebo-treated littermates. While the placebo-treated mice showed a significant progression of their phenotype within the four weeks treatment period, RD2RD2 treatment was able to slow progression of the disease phenotype and especially the motor deficits to an extent that during the four weeks treatment duration, no significant progression was observed in any of the motor experiments. Significant changes between the groups were already apparent after two treatment weeks. Further investigations on motor deficits were conducted by the modified pole test, a test measuring complex motor behaviour. Impairment of the motor skills of SOD1*G93A mice progressed slowly but significantly in the placebo group, but not in the RD2RD2-treated group. A limitation of the study is certainly the limited treatment duration, which is attributed to the use of the Alzet minipumps, not allowing statements beyond the four weeks treatment. Additionally, the use of only female mice could possibly have an impact on the variability of the results, as it is described for SOD1*G93A mice on a C57BL/6 background, for the rotarod performance [41].

In addition to the clinical symptoms like motor deficits, neuroinflammation is one prominent pathological hallmark of ALS, and previous studies demonstrated the key role of activated astrocytes and microglia cells in disease progression [17,21]. RD2RD2 treatment led to decreased levels of gliosis in the brain stem and reduced levels of astrogliosis in the lumbar spinal cord in RD2RD2-treated SOD1*G93A mice vs. placebo-treated littermates, indicating that RD2RD2 treatment efficiently reduced neuroinflammation. Furthermore, we investigated the density of neurons in the motor cortex and brain stem. Motor cortex neurons regulate the control of motor output and selectively degenerate in ALS [47]. During disease progression, degeneration of neurons of the motor cortex and brain stem causes muscle weakness and deficits in motor performance. Analysis of the neuronal nuclei in brain stem and motor cortex revealed a loss of neurons in SOD1*G93A mice in comparison to non-transgenic littermates, as described previously by others [48,49]. However, there was a significantly higher density of neurons in both the motor cortex and brain stem of RD2RD2- vs. placebo-treated mice. This supports our assumption that RD2RD2 has a beneficial effect on neuronal survival in this mouse model of ALS.

The pharmacokinetic characteristics including blood–brain barrier (BBB) penetration ability for RD2RD2 have not been determined, yet. However, for closely related compounds (RD2 and other derivatives), the pharmacokinetic profile and sufficient uptake into the brain have already been demonstrated [37,50–52]. Additionally, the BBB is known to be compromised in SOD1*G93A mice [53,54] allowing higher brain penetration as compared to wildtype mice. Therefore, we assume sufficient brain uptake for RD2RD2 but cannot exclude a major effect of the substance on the peripheral immune system, which in turn may attenuate inflammation systemically.

Because the target of RD2RD2 is not known yet, we speculate hypothetically about potential targets. RD2RD2 was developed for the direct disassembly of A β peptide oligomers into monomers. It was shown that in a double transgenic mouse line that overexpresses

human SOD1*G93A and human APP-C100, the overexpression of A β is associated with an acceleration of onset of motor impairment and SOD1*G93A aggregation [55]. Thus, it could possibly be that RD2RD2 acts via its original mode of action. However, the link between SOD1 and A β was only shown in mice that overexpress both human proteins. In our study the mice overexpress only a mutant version of human SOD1, but have endogenous murine A β , thus it is very unlikely that murine A β is the main target of RD2RD2 in this experimental set up. RD2RD2 contains 10 arginine residues, which is why it can be assigned to the class of cationic arginine-rich cell-penetrating peptides (CPP). It has been reported that CPPs display anti-inflammatory and neuroprotective properties in traumatic brain injury and stroke [56,57]. In this context it has been hypothesised that the neuroprotective effect of CPPs is mediated by internalisation of neuronal cell surface structures like transporters or ion channels, as a result of endocytosis thereby leading for example to a reduction of calcium ion influx associated with excitotoxicity and other receptor-mediated neurotoxicity inducing signalling pathways [58]. After internalisation CPPs possibly also act on other targets like proprotein convertase (PCs), as it was shown that some poly-arginine peptides were potent inhibitors of PCs of the constitutive secretory pathway (PC5/6, PC7 and furin) [59]. The inhibition of furin could possibly protect against neuronal cell death induced by activated *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, as it was shown for two furin inhibitor by Yamada et al. [60]. Other hypothetical targets could possibly be receptors like the ionotropic P2X and metabotropic P2Y purinergic receptor, which can activate microglia after induction via ATP which is released by dying and abnormally functioning neurons and which play a key role in neuroinflammatory processes [61]. For example, the P2X₇ receptor isoform was found to be localised on glia cells [62,63] and activation of the P2X₇ receptor leads to an inflammatory stimulus of pro-inflammatory cytokines like interleukin-1 β , a key mediator in neurodegeneration [64,65]. Whereas the loss of function of the P2X₇ receptor in C57BL/6-J mice resulted in a substantially attenuated inflammatory response [66]. Moreover, the inhibition of the receptor with an antagonist led to an improved phenotype progression in SOD1*G93A mice [67]. Non-specific binding of RD2RD2 to the purinergic P2X receptor might also be a possible explanation for our results.

In summary, RD2RD2 demonstrated therapeutic efficacy in the SOD1*G93A ALS mouse model. Treatment with RD2RD2 led to a reduction of activated glia cell levels in the brain stem and lumbar spinal cord in SOD1*G93A mice. Analysis of neurons in the brain revealed a neuroprotective function of RD2RD2 in treated mice. The phenotype progression of SOD1*G93A mice was halted at treatment start, as there was no significant progression during the treatment period. So far, the direct target of RD2RD2 is unknown. Therefore, future studies will focus on how RD2RD2 affects neuroinflammation and ALS pathogenesis. However, based on the presented results, we conclude that RD2RD2 is a potential therapeutic candidate against ALS.

4. Materials and Methods

4.1. Ethical Approval

All applicable international and national guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the study was conducted. All animal experiments, including details on design, protocols and analysis plan, were performed in accordance with the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines, the German Law on the protection of animals (TierSchG §§ 7-9) and with permit from the local ethics committee (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV), North Rhine-Westphalia, Germany; AZ 84-02.04.2015.A106 and AZ 84-02.04.2014.A423). Experimental protocols, including study design and analysis plan, were reviewed and approved by the animal welfare commission of the local authority (LANUV, North Rhine-Westphalia, Germany).

4.2. Animals

Transgenic SOD1*G93A mice and their non-transgenic littermates were bred from male mice transgenic for human SOD1*G93A (B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J mice, carrying a high copy number of the transgene, purchased from JAX (The Jackson Laboratory, ME, USA)) and female C57BL/6-J mice obtained from CRIVER (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany). For breeding only male transgenic SOD1*G93A mice were used, as transgenic SOD1*G93A females are poor breeders. Due to this limitation only sufficiently large groups of female mice were available for this treatment study. Progenies were analysed for presence of the human SOD1 gene by quantitative PCR, as previously described [46]. Copy numbers of the transgene were checked by calculation of the delta cycle threshold (ΔCT) = $CT_{\text{internal control}} - CT_{\text{gene of interest}}$. Female SOD1*G93A mice with a high copy number of the transgene were selected for stratified randomisation into equally groups. Housing of the animals was under the same terms at the animal facility of the Forschungszentrum Jülich as described previously [35,68].

4.3. Study Drug

The D-peptide RD2RD2 (amino acid sequence: pthlthnrrrrrrpthlthnrrrrr, 3.2 kDa) was purchased from peptides & elephants (Potsdam, Germany) and Cambridge Peptides (Cambridge Peptides, Birmingham, UK) as lyophilized powder with a minimal purity of 95%. The peptide consists of 24 D-enantiomeric amino acid residues with its C-terminus being amidated.

4.4. Treatment

Twelve weeks old female SOD1*G93A mice and their non-transgenic littermates were treated intraperitoneally by use of Alzet osmotic minipumps (Alzet osmotic minipumps, model #1004, Alzet, USA). SOD1*G93A mice were treated with 10 mg per minipump equalling 19 mg/kg/d RD2RD2 ($n = 12$) or with physiological saline at pH 7.0 (placebo $n = 10$) as control group. Non-transgenic littermates (ntg = 13) were treated intraperitoneally with placebo exactly like the transgenic placebo group. The RD2RD2 dosage was chosen based on successful former experiments with related compounds. RD2RD2 was dissolved in sterile physiological saline at pH 7.0 and placed in minipumps for 24 h prior to implantation. The next day, the pumps were implanted intraperitoneally. In short, mice were anaesthetised with isoflurane, the skin and the muscle layer below was cut in the midline and the pump was inserted in the abdominal cavity. Following placement of the pump, the wound was sutured. All mice received three days of carprofen treatment after surgery (day of surgery plus two days after). Mice were monitored regularly for possible complications related to the surgical intervention and were medically attended. The sutures were removed aseptically approximately 7 to 10 days after surgery.

4.5. Body Weight of SOD1*G93A Mice

The weight of the SOD1*G93A animals was recorded at least three times per week beginning prior to pump implantation. Weighing was always performed between 8 a.m. and 9 a.m. to avoid diurnal variations.

4.6. Behavioural Assessment

SOD1*G93A mice were tested longitudinally in different behavioural set ups (SHIRPA and modified pole test). Each behavioural test of the SOD1*G93A mice was performed before treatment (baseline measurements) and one week after the implantation (first trial day: $8 \text{ d} \pm 1 \text{ d}$ after implantation; criteria: general health, i.e., weight gain, look of fur, posture, and motor activity). The experimenter was blind to genotype or treatment. All tests were carried out at the same time of the day. Before each test, all mice were allowed to habituate in a single cage for 30 min. All mice were observed daily for disease progression.

4.6.1. Phenotype Assessment

The primary screen of the SHIRPA test battery was used to assess the phenotype [39,40]. This test consisted of the following subtests, which are scored by the experimenter and summed up to an individual SHIRPA score: restlessness, alertness, startle response, pinna reflex, corneal reflex, touch response, pain response, grooming, and apathy, abnormal body carriage, abnormal gait, loss of righting reflex, forelimb placing reflex, hanging behaviour, hind limb tremor. The last seven tests mentioned above represent motor abilities of the mice and are additionally summed up to a motor score. Mice were individually tested and scored in an arena of 42.5 cm × 18.0 cm × 26.5 cm (L × H × W). Scoring was defined from 0 (similar to ntg littermates) to 3 (extremely abnormal from ntg littermates).

4.6.2. Modified Pole Test

The modified pole test [68] is a sensitive functional test to measure early changes in the motor behaviour of the SOD1*G93A mice. The following modifications were realised: The mice were placed with the head downwards instead of upwards on a vertical pole (height 50 cm, diameter 1.2 cm, rough-surfaced) and their movement downwards was rated. The runs were scored from 0 to 3 (0 continuous run, 1 part-way runs, 2 slipping downwards and 3 falling down). This procedure was performed three times and the sum of all three scores was used for analysis.

4.6.3. Disease Onset

To monitor the disease progression of the SOD1*G93A mice, all animals were inspected daily for signs of motor deficits. Disease onset was determined after Mead et al. in 2011 [41] if the following criteria were both met: “Point at which defects in hind limb splay and enhanced tremor were observed with a score of at least 1 in each category”.

4.7. Tissue Collection

At the end of the study, SOD1*G93A and non-transgenic mice were sacrificed for histopathological analysis. Brains and spinal cords of all mice were removed and snap frozen in −80 °C isopentane. Sagittal brain sections of 20 µm were cut using a cryotome (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany). In addition, 12 µm transversal sections of the lumbar spinal cord were harvested. The left brain hemisphere and the lumbar spinal cord (L1-L5 tract) were used for immunohistological analysis. The lumbar region of the spinal cord was identified as described previously [69,70]. Furthermore, the muscle *M. gastrocnemius* of both hind limbs were harvested along with brain and spinal cord tissues and weighted using a micro scale. Afterward, the muscles were incubated in 4% paraformaldehyde for 1 h, followed by an incubation in 30% sucrose solution for 2 h. Muscles were snap frozen in −80 °C isopentane and then cut in transversal sections using a cryotome (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany). Samples were stored at −80 °C until further processing.

4.8. Immunohistochemical Staining

Gliosis (antibodies GFAP for astrocytes and CD11b for microglia) and neuronal survival (antibody NeuN for mature neurons) were assessed by immunohistochemical analysis. Tissue sections were fixed with 4% paraformaldehyde and treated with 70% formic acid for antigen retrieval. The sections were rinsed and treated with 3% H₂O₂ in methanol for elimination of endogenous peroxidases. After a further washing step, sections were incubated with the primary antibody overnight at 4 °C in a humid chamber (GFAP: DAKO Agilent Technologies, Santa Clara, USA; NeuN: Merck Millipore, Darmstadt, Germany) or for 2 h at room temperature (RT) (CD11b: Abcam, Cambridge, UK). Primary antibodies were diluted 1:1000 in tris buffered saline with 1% Triton X-100 (TBST) with 1% bovine serum albumin (BSA) (GFAP and NeuN) or 1:2000 in tris buffered saline (TBS) with 1% BSA (CD11b).

Afterwards, immunolabelled sections with GFAP, NeuN and CD11b antibody were rinsed and incubated with biotinylated secondary anti-mouse or anti-rabbit antibody (1:1000 in TBST with 1% BSA (GFAP and NeuN) or in TBS with 1% BSA (CD11b), Sigma Aldrich, Germany) for 2 h at RT followed by 3, 3'-Diaminobenzidine enhanced with saturated nickel ammonium sulfate solution.

Muscle degeneration of the *M. gastrocnemius* were visualised by haematoxylin and eosin (H&E) staining. Thawed tissue sections were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and rinsed with tap water. The sections were placed in a staining cuvette and treated with haematoxylin for three minutes at RT. After another tap water rinse, sections were incubated in eosin solution for two minutes at RT, followed by a further rinse in tap water. Immunohistochemical sections of brain, lumbar spinal cord and *M. gastrocnemius* were mounted with DPX Mountant medium (Sigma Aldrich, Germany) after washing in an ascending alcohol series.

4.9. Quantification

Images of SOD1*G93A sections were taken with a LMD6000 microscope (Leica Camera, Wetzlar, Germany) and LAS 4.0 software (Leica, Wetzlar, Germany). Immunoreactive microglial cells (antibody CD11b) and astrogliosis (antibody GFAP) were determined as percentage area (%) of the neuropil occupied by GFAP or CD11b immunoreactivity or of neuron nuclei (antibody NeuN) as count per stained area using ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, USA) and CellProfiler Analyst (Broad Institute, Boston, USA) [71,72]. To avoid deviations in the analysis of the region of interest in the brain stem and motor cortex, a standard circle or rectangle was created with the ImageJ program. The whole tissue sections of the lumbar spinal cord were freehand selected with the ImageJ program and quantified. Histopathology analyses in SOD1*G93A were carried out in brain stem and lumbar spinal cord. The CD11b immunoreactive area was analysed in the brain stem and lumbar spinal cord (brain stem: 3 to 4 slides per mouse, ntg $n = 13$, RD2RD2 $n = 12$, placebo $n = 10$ and lumbar spinal cord: 4 to 8 slides per mouse, ntg $n = 11$, RD2RD2 $n = 11$, placebo $n = 10$). The GFAP immunoreactive area was analysed in the brain stem and lumbar spinal cord (brain stem: 4 to 6 slides per mouse, ntg $n = 13$, RD2RD2 $n = 11$, placebo $n = 9$ and lumbar spinal cord: 4 to 8 slides per mouse, ntg $n = 12$, RD2RD2 $n = 10$, placebo $n = 8$). NeuN counts were analysed in the brain stem and motor cortex layers 2/3 and 5 (brain stem: 3 to 5 slides per mouse, ntg $n = 11$, RD2RD2 $n = 11$, placebo $n = 8$ and motor cortex: 4 to 5 slides per mouse, ntg $n = 10$, RD2RD2 $n = 10$, placebo $n = 10$).

4.10. Statistics

Statistical analyses were performed using SigmaPlot Version 11 (Systat Software, Germany) and GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., USA) was used for the graphic illustrations. Presentation of data as mean $\pm$ SEM (behavioural tests and histochemical analysis), $p > 0.05$ was considered as not significant (ns). Normal distribution of data was tested by use of Shapiro–Wilk normality test (SigmaPlot Version 11, Systat Software, Germany). Two-way repeated measurement (RM) ANOVA with Fisher's Least Significant Difference (LSD) post hoc analysis was used to analyse the results of the behavioural tests of SOD1*G93A mice (body weight, SHIRPA test, modified pole test). One-way measurement ANOVA with Fisher's least significant difference (LSD) post hoc analysis was used to analyse the results of the histochemical analysis.

Supplementary Materials: The following are available online, Figure S1: Analysis of neuroinflammation in cortex and hippocampus of RD2RD2-treated APP/PS1 mice; Figure S2: Treatment with RD2RD2 significantly reduced levels of inflammatory markers in the plasma of APP/PS1 mice; Figure S3: Phenotype assessment of SOD1*G93A mice and their non-transgenic littermates; Table S1. Treatment with RD2RD2 significantly reduced gliosis in APP/PS1 mice.; Table S2: Cytokine assay of RD2RD2- and placebo-treated APP/PS1 mice. References from Supplementary materials [71,73–75].

Author Contributions: Conceptualisation and study design, D.W., A.W. and J.K.; investigations, A.W., J.K. and J.P.; methodology/experiments, J.P., V.K. and A.S.; data and statistical analysis, J.P.; visualisation, J.P.; writing—original draft preparation, J.P.; writing—review and editing, D.W., A.W. and J.K.; supervision, D.W., A.W. and J.K.; scientific advice, P.L., N.J.S. and K.-J.L.; project administration, D.W., A.W. and J.K.; funding acquisition, D.W. and K.-J.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: D.W. was supported by grants from the Russian Science Foundation (RSF) (project no. 20-64-46027) and by the Technology Transfer Fund of the Forschungszentrum Jülich. K.-J.L. and D.W. were supported by “Portfolio Drug Research” of the “Impuls und Vernetzungs-Fonds der Helmholtzgemeinschaft”.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the German Law on the protection of animals (TierSchG §§ 7-9) and with permit from the local Ethics Committee (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV), North Rhine-Westphalia, Germany; reference number: AZ 84-02.04.2015.A106 and AZ 84-02.04.2014.A423).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: Not applicable.

Conflicts of Interest: D.W. is co-inventor of patents covering the composition of matter of RD2RD2. D.W. and A.W. are co-founders and shareholders of the company “Priavoid GmbH”, which is planning to further develop RD2RD2. Both declare that this did not influence the interpretation of the study results. All other authors declare no competing interests.

Sample Availability: Samples of the compound are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Cacquevel, M.; Lebeurrier, N.; Chéenne, S.; Vivien, D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer’s disease. *Curr. Drug Targets* **2004**, *5*, 529–534. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Maeda, J.; Ji, B.; Irie, T.; Tomiyama, T.; Maruyama, M.; Okauchi, T.; Staufenbiel, M.; Iwata, N.; Ono, M.; Saido, T.C.; et al. Longitudinal, Quantitative Assessment of Amyloid, Neuroinflammation, and Anti-Amyloid Treatment in a Living Mouse Model of Alzheimer’s Disease Enabled by Positron Emission Tomography. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 10957–10968. [\[CrossRef\]](#)
3. Pgostinho, P.; Rodrigo, A.C.; Catarina, O. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 2766–2778. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Heneka, M.T.; Carson, M.J.; El Khoury, J.; Landreth, G.; Brosseron, F.; Feinstein, D.L.; Jacobs, A.H.; Wyss-Coray, T.; Vitorica, J.; Ransohoff, R.M.; et al. Neuroinflammation in Alzheimer’s disease. *Lancet Neurol.* **2015**, *14*, 388–405. [\[CrossRef\]](#)
5. Mitchell, J.; Borasio, G. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* **2007**, *369*, 2031–2041. [\[CrossRef\]](#)
6. Cleveland, D.W.; Rothstein, J.D. From charcot to lou gehrig: Deciphering selective motor neuron death in als. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*, 806–819. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Deng, H.X.; Hentati, A.; A Tainer, J.; Iqbal, Z.; Cayabyab, A.; Hung, W.Y.; Getzoff, E.D.; Hu, P.; Herzfeldt, B.; Roos, R.P.; et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science* **1993**, *261*, 1047–1051. [\[CrossRef\]](#)
8. Rosen, D.R.; Siddique, T.; Patterson, D.; Figlewicz, D.A.; Sapp, P.C.; Hentati, A.; Donaldson, D.H.; Goto, J.; O’Regan, J.P.; Deng, H.-X.; et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **1993**, *362*, 59–62. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Gurney, M.E.; Pu, H.; Chiu, A.Y.; Dal Canto, M.C.; Polchow, C.Y.; Alexander, D.D.; Caliendo, J.; Hentati, A.; Kwon, Y.W.; Deng, H.X.; et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **1994**, *264*, 1772–1775. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Gurney, M.E. The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. *J. Neurol. Sci.* **1997**, *152*, s67–s73. [\[CrossRef\]](#)
11. Wang, L.; Sharma, K.; Deng, H.-X.; Siddique, T.; Grisotti, G.; Liu, E.; Roos, R.P. Restricted expression of mutant SOD1 in spinal motor neurons and interneurons induces motor neuron pathology. *Neurobiol. Dis.* **2008**, *29*, 400–408. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Özdinler, P.H.; Benn, S.; Yamamoto, T.H.; Güzel, M.; Brown, R.H.; Macklis, J.D. Corticospinal Motor Neurons and Related Subcerebral Projection Neurons Undergo Early and Specific Neurodegeneration in hSOD1G93A Transgenic ALS Mice. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 4166–4177. [\[CrossRef\]](#)

13. Rothstein, J.D. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **2009**, *65*, S3–S9. [\[CrossRef\]](#)
14. Philips, T.; Robberecht, W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol.* **2011**, *10*, 253–263. [\[CrossRef\]](#)
15. Robberecht, W.; Philips, T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 248–264. [\[CrossRef\]](#)
16. Jara, J.H.; Genç, B.; Stanford, M.J.; Pytel, P.; Roos, R.P.; Weintraub, S.; Mesulam, M.M.; Bigio, E.H.; Miller, R.J.; Özdinler, P.H. Evidence for an early innate immune response in the motor cortex of ALS. *J. Neuroinflamm.* **2017**, *14*, 129. [\[CrossRef\]](#)
17. Boillée, S.; Yamanaka, K.; Lobsiger, C.S.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; Kassiotis, G.; Kollias, G.; Cleveland, D.W. Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia. *Science* **2006**, *312*, 1389–1392. [\[CrossRef\]](#)
18. Hensley, K.; Abdel-Moaty, H.; Hunter, J.; Mhatre, M.; Mou, S.; Nguyen, K.; Potapova, T.; Pye, Q.N.; Qi, M.; Rice, H.; et al. Primary glia expressing the G93A-SOD1 mutation present a neuroinflammatory phenotype and provide a cellular system for studies of glial inflammation. *J. Neuroinflamm.* **2006**, *3*, 2. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Patel, N.S.; Paris, D.; Mathura, V.; Quadros, A.N.; Crawford, F.C.; Mullan, M.J. Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflamm.* **2005**, *2*, 9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Heneka, M.T.; Kummer, M.P.; Stutz, A.; Delekate, A.; Schwartz, S.; Vieira-Saecker, A.; Griep, A.; Axt, D.; Remus, A.; Tzeng, T.-C.; et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *493*, 674–678. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Lewis, C.-A.; Manning, J.; Rossi, F.; Krieger, C. The Neuroinflammatory Response in ALS: The Roles of Microglia and T Cells. *Neurol. Res. Int.* **2012**, *2012*, 1–8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Greenhalgh, C.J.; Hilton, D.J. Negative regulation of cytokine signaling. *J. Leukoc. Biol.* **2001**, *70*, 348–356. [\[CrossRef\]](#)
23. Turner, M.D.; Nedjai, B.; Hurst, T.; Pennington, D.J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 2563–2582. [\[CrossRef\]](#)
24. Elliott, J.L. Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Brain Res.* **2001**, *95*, 172–178. [\[CrossRef\]](#)
25. McGeer, P.L.; McGeer, E.G. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **2002**, *26*, 459–470. [\[CrossRef\]](#)
26. Jeyachandran, A.; Mertens, B.; McKissick, E.A.; Mitchell, C.S. Type I Vs. Type II cytokine levels as a function of SOD1 G93A mouse amyotrophic lateral sclerosis disease progression. *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *9*, 462. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Brooks, B.R.; Miller, R.G.; Swash, M.; Munsat, T.L. El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* **2000**, *1*, 293–299. [\[CrossRef\]](#)
28. Miller, R.G.; Mitchell, J.D.; Moore, D.H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**, *2012*, CD001447. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Dorst, J.; Ludolph, A.C.; Huebers, A. Disease-modifying and symptomatic treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2017**, *11*, 1–16. [\[CrossRef\]](#)
30. Zhang, T.; Loschwitz, J.; Strodel, B.; Nagel-Steger, L.; Willbold, D. Interference with Amyloid- β Nucleation by Transient Ligand Interaction. *Molecules* **2019**, *24*, 2129. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Willbold, D.; Kutzsche, J. Do We Need Anti-Prion Compounds to Treat Alzheimer's Disease? *Molecules* **2019**, *24*, 2237. [\[CrossRef\]](#)
32. Kutzsche, J.; Jürgens, D.; Willuweit, A.; Ademann, K.; Fuchs, C.; Simons, S.; Windisch, M.; Hümpel, M.; Rossberg, W.; Wolzt, M.; et al. Safety and pharmacokinetics of the orally available antiprion compound PRI-002: A single and multiple ascending dose phase I study. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2020**, *6*, e12001. [\[CrossRef\]](#)
33. Van Groen, T.; Schemmert, S.; Brener, O.; Gremer, L.; Ziehm, T.; Tusche, M.; Nagel-Steger, L.; Kadish, I.; Schartmann, E.; Elfgen, A.; et al. The A β oligomer eliminating D-enantiomeric peptide RD2 improves cognition without changing plaque pathology. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Kutzsche, J.; Schemmert, S.; Tusche, M.; Neddens, J.; Rabl, R.; Jürgens, D.; Brener, O.; Willuweit, A.; Hutter-Paier, B.; Willbold, D. Large-Scale Oral Treatment Study with the Four Most Promising D3-Derivatives for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Molecules* **2017**, *22*, 1693. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Schemmert, S.; Schartmann, E.; Zafiu, C.; Kass, B.; Hartwig, S.; Lehr, S.; Bannach, O.; Langen, K.-J.; Shah, N.J.; Kutzsche, J.; et al. A β Oligomer Elimination Restores Cognition in Transgenic Alzheimer's Mice with Full-blown Pathology. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 2211–2223. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Schemmert, S.; Schartmann, E.; Honold, D.; Zafiu, C.; Ziehm, T.; Langen, K.-J.; Shah, N.J.; Kutzsche, J.; Willuweit, A.; Willbold, D. Deceleration of the neurodegenerative phenotype in pyroglutamate-A β accumulating transgenic mice by oral treatment with the A β oligomer eliminating compound RD2. *Neurobiol. Dis.* **2019**, *124*, 36–45. [\[CrossRef\]](#)
37. Leithold, L.H.; Jiang, N.; Post, J.; Niemietz, N.; Schartmann, E.; Ziehm, T.; Kutzsche, J.; Shah, N.J.; Breitkreutz, J.; Langen, K.-J.; et al. Pharmacokinetic properties of tandem D-peptides designed for treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *89*, 31–38. [\[CrossRef\]](#)
38. Elfgen, A.; Hupert, M.; Bochinsky, K.; Tusche, M.; Martin, E.G.D.S.R.; Gering, I.; Sacchi, S.; Pollegioni, L.; Huesgen, P.F.; Hartmann, R.; et al. Metabolic resistance of the D-peptide RD2 developed for direct elimination of amyloid- β oligomers. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
39. Rogers, D.C.; Fisher, E.M.C.; Brown, S.D.M.; Peters, J.; Hunter, A.J.; Martin, J.E. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm. Genome* **1997**, *8*, 711–713. [\[CrossRef\]](#)

40. Rogers, D.C.; Peters, J.; Martin, J.E.; Ball, S.; Nicholson, S.J.; Witherden, A.S.; Hafezparast, M.; Latham, J.; Robinson, T.L.; Quilter, C.A.; et al. SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: Validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neurosci. Lett.* **2001**, *306*, 89–92. [\[CrossRef\]](#)
41. Mead, R.J.; Bennett, E.J.; Kennerley, A.J.; Sharp, P.; Sunyach, C.; Kasher, P.; Berwick, J.; Pettmann, B.; Battaglia, G.; Azzouz, M.; et al. Optimised and Rapid Pre-clinical Screening in the SOD1G93A Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23244. [\[CrossRef\]](#)
42. Cummings, J.; Lee, G.; Ritter, A.; Zhong, K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2018**, *4*, 195–214. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Miao, J.; Xu, F.; Davis, J.; Otte-Höller, I.; Verbeek, M.M.; Van Nostrand, W.E. Cerebral Microvascular Amyloid β Protein Deposition Induces Vascular Degeneration and Neuroinflammation in Transgenic Mice Expressing Human Vasculotropic Mutant Amyloid β Precursor Protein. *Am. J. Pathol.* **2005**, *167*, 505–515. [\[CrossRef\]](#)
44. Craft, J.M.; Watterson, D.M.; Van Eldik, L.J. Human amyloid β -induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration. *Glia* **2006**, *53*, 484–490. [\[CrossRef\]](#)
45. Lewis, E.K.; Rasmussen, A.L.; Bennett, W.; King, A.; West, A.K.; Chung, R.S.; Chuah, M.I. Microglia and motor neurons during disease progression in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: Changes in arginase1 and inducible nitric oxide synthase. *J. Neuroinflamm.* **2014**, *11*, 55. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Ohgomori, T.; Yamasaki, R.; Takeuchi, H.; Kadomatsu, K.; Jinno, S.; Kira, J.-I. Differential activation of neuronal and glial STAT3 in the spinal cord of the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* **2017**, *46*, 2001–2014. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Fogarty, M.J.; Noakes, P.G.; Bellingham, M.C. Motor Cortex Layer V Pyramidal Neurons Exhibit Dendritic Regression, Spine Loss, and Increased Synaptic Excitation in the Presymptomatic hSOD1G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 643–647. [\[CrossRef\]](#)
48. An, T.; Shi, P.; Duan, W.; Zhang, S.; Yuan, P.; Li, Z.; Wu, D.; Xu, Z.; Li, C.; Guo, Y. Oxidative Stress and Autophagic Alteration in Brainstem of SOD1-G93A Mouse Model of ALS. *Mol. Neurobiol.* **2014**, *49*, 1435–1448. [\[CrossRef\]](#)
49. Solomonov, Y.; Hadad, N.; Levy, R. Reduction of cytosolic phospholipase A2 α upregulation delays the onset of symptoms in SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroinflamm.* **2016**, *13*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
50. Jiang, N.; Leithold, L.H.E.; Post, J.; Ziehm, T.; Mauler, J.; Gremer, L.; Cremer, M.; Schartmann, E.; Shah, N.J.; Kutzsche, J.; et al. Preclinical Pharmacokinetic Studies of the Tritium Labelled D-Enantiomeric Peptide D3 Developed for the Treatment of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0128553. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Leithold, L.H.E.; Jiang, N.; Post, J.; Ziehm, T.; Schartmann, E.; Kutzsche, J.; Shah, N.J.; Breitkreutz, J.; Langen, K.-J.; Willuweit, A.; et al. Pharmacokinetic Properties of a Novel d-Peptide Developed to be Therapeutically Active Against Toxic β -Amyloid Oligomers. *Pharm. Res.* **2015**, *33*, 328–336. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Schartmann, E.; Schemmert, S.; Ziehm, T.; Leithold, L.H.E.; Jiang, N.; Tusche, M.; Shah, N.J.; Langen, K.-J.; Kutzsche, J.; Willbold, D.; et al. Comparison of blood-brain barrier penetration efficiencies between linear and cyclic all-d-enantiomeric peptides developed for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *114*, 93–102. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Garbuzova-Davis, S.; Haller, E.; Saporta, S.; Kolomey, I.; Nicosia, S.V.; Sanberg, P.R. Ultrastructure of blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS. *Brain Res.* **2007**, *1157*, 126–137. [\[CrossRef\]](#)
54. Garbuzova-Davis, S.; Saporta, S.; Haller, E.; Kolomey, I.; Bennett, S.P.; Potter, H.; Sanberg, P.R. Evidence of Compromised Blood-Spinal Cord Barrier in Early and Late Symptomatic SOD1 Mice Modeling ALS. *PLoS ONE* **2007**, *2*, e1205. [\[CrossRef\]](#)
55. Li, Q.-X.; Mok, S.S.; Laughton, K.M.; McLean, C.A.; Volitakis, I.; Cherny, R.A.; Cheung, N.S.; White, A.R.; Masters, C.L. Overexpression of A β is associated with acceleration of onset of motor impairment and superoxide dismutase 1 aggregation in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Aging Cell* **2006**, *5*, 153–165. [\[CrossRef\]](#)
56. Chiu, L.S.; Anderton, R.S.; Cross, J.L.; Clark, V.W.; Knuckey, N.W.; Meloni, B.P. Poly-arginine Peptide R18D Reduces Neuroinflammation and Functional Deficits Following Traumatic Brain Injury in the Long-Evans Rat. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2019**, *25*, 1563–1572. [\[CrossRef\]](#)
57. Chiu, L.S.; Anderton, R.S.; Knuckey, N.W.; Meloni, B.P. The neuroprotective potential of arginine-rich peptides for the acute treatment of traumatic brain injury. *Expert Rev. Neurother.* **2016**, *16*, 361–363. [\[CrossRef\]](#)
58. Meloni, B.P.; Milani, D.; Edwards, A.B.; Anderton, R.S.; Doig, R.L.O.; Fitzgerald, M.; Palmer, T.N.; Knuckey, N.W. Neuroprotective peptides fused to arginine-rich cell penetrating peptides: Neuroprotective mechanism likely mediated by peptide endocytic properties. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *153*, 36–54. [\[CrossRef\]](#)
59. Fugere, M.; Appel, J.; Houghten, R.A.; Lindberg, I.; Day, R. Short polybasic peptide sequences are potent inhibitors of PC5/6 and PC7: Use of positional scanning-synthetic peptide combinatorial libraries as a tool for the optimization of inhibitory sequences. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*, 323–332. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Yamada, M.; Hayashi, H.; Yuuki, M.; Matsushima, N.; Yuan, B.; Takagi, N. Furin inhibitor protects against neuronal cell death induced by activated NMDA receptors. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5212. [\[CrossRef\]](#)
61. Skaper, S.D.; Debetto, P.; Giusti, P. The P2X₇ purinergic receptor: From physiology to neurological disorders. *FASEB J.* **2009**, *24*, 337–345. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

62. Yiangou, Y.; Facer, P.; Durrenberger, P.; Chessell, I.P.; Naylor, A.; Bountra, C.; Banati, R.R.; Anand, P. COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol.* **2006**, *6*, 12. [CrossRef] [PubMed]
63. D'Ambrosi, N.; Finocchi, P.; Apolloni, S.; Cozzolino, M.; Ferri, A.; Padovano, V.; Pietrini, G.; Carri, M.T.; Volonté, C. The Proinflammatory Action of Microglial P2 Receptors Is Enhanced in SOD1 Models for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 4648–4656. [CrossRef] [PubMed]
64. Allan, S.M.; Rothwell, N.J. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*, 734–744. [CrossRef]
65. Ferrari, D.; Chiozzi, P.; Falzoni, S.; Hanau, S.; Di Virgilio, F. Purinergic Modulation of Interleukin-1 β Release from Microglial Cells Stimulated with Bacterial Endotoxin. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 579–582. [CrossRef] [PubMed]
66. Miller, C.M.; Zakrzewski, A.M.; Ikin, R.J.; Boulter, N.R.; Katrib, M.; Lees, M.P.; Fuller, S.J.; Wiley, J.S.; Smith, N.C. Dysregulation of the inflammatory response to the parasite, *Toxoplasma gondii*, in P2X7 receptor-deficient mice. *Int. J. Parasitol.* **2011**, *41*, 301–308. [CrossRef]
67. Ruiz-Ruiz, C.; García-Magro, N.; Negro, P.; Avendaño, C.; Bhattacharya, A.; Ceusters, M.; García, A.G. Chronic administration of P2X7 receptor antagonist [JNJ-47965567] delays disease onset and progression, and improves motor performance in ALS SOD1G93A female mice. *Dis. Model. Mech.* **2020**, *13*, dmm045732. [CrossRef]
68. Dunkelmann, T.; Schemmert, S.; Honold, D.; Teichmann, K.; Butzküven, E.; DeMuth, H.-U.; Shah, N.J.; Langen, K.-J.; Kutzsche, J.; Willbold, D.; et al. Comprehensive Characterization of the Pyroglutamate Amyloid- β Induced Motor Neurodegenerative Phenotype of TBA2.1 Mice. *J. Alzheimer's Dis.* **2018**, *63*, 115–130. [CrossRef]
69. Tadros, M.A.; Harris, B.M.; Anderson, W.B.; Brichta, A.M.; Graham, B.A.; Callister, R.J. Are all spinal segments equal: Intrinsic membrane properties of superficial dorsal horn neurons in the developing and mature mouse spinal cord. *J. Physiol.* **2012**, *590*, 2409–2425. [CrossRef]
70. Hugnot, J.-P. Isolate and Culture Neural Stem Cells from the Mouse Adult Spinal Cord. *Adv. Struct. Saf. Stud.* **2013**, *1059*, 53–63. [CrossRef]
71. Ferreira, T.; Rasband, W. The Image J User Guide. 2011. Available online: <https://imagej.net/docs/guide/146.html> (accessed on 21 January 2021).
72. McQuin, C.; Goodman, A.; Chernyshev, V.; Kamensky, L.; Cimini, B.A.; Karhohs, K.W.; Doan, M.; Ding, L.; Rafelski, S.M.; Thirstrup, D.; et al. CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLoS Biol.* **2018**, *16*, e2005970. [CrossRef] [PubMed]
73. Holcomb, L.; Gordon, M.N.; McGowan, E.; Yu, X.; Benkovic, S.; Jantzen, P.T.; Wright, K.; Saad, I.; Mueller, R.; Morgan, D.; et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 97–100. [CrossRef]
74. Webster, B.; Hansen, L.; Adame, A.; Crews, L.; Torrance, M.; Thal, L.; Masliah, E. Astroglial Activation of Extracellular-Regulated Kinase in Early Stages of Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2006**, *65*, 142–151. [CrossRef] [PubMed]
75. Hwang, I.K.; Choi, J.H.; Li, H.; Yoo, K.-Y.; Kim, D.W.; Lee, C.H.; Yi, S.S.; Seong, J.K.; Lee, I.S.; Yoon, Y.S.; et al. Changes in Glial Fibrillary Acidic Protein Immunoreactivity in the Dentate Gyrus and Hippocampus Proper of Adult and Aged Dogs. *J. Veter. Med. Sci.* **2008**, *70*, 965–969. [CrossRef] [PubMed]

A Novel Anti-Inflammatory D-Peptide Inhibits Disease Phenotype Progression in an ALS Mouse Model

Julia Post ¹, Vanessa Kogel ¹, Anja Schaffrath ¹, Philipp Lohmann ², N. Jon Shah ^{2,3,4,5} and Karl-Josef Langen ^{2,6}, Dieter Willbold ^{1,7,*}, Antje Willuweit ^{2,*} and Janine Kutzsche ^{1,*}

¹ Institute of Biological Information Processing, Structural Biochemistry, IBI-7, Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Jülich, Germany; j.post@fz-juelich.de (J.P.); vkogel@ukaachen.de (V.K.); a.schaffrath@fz-juelich.de (A.S.)

² Institute of Neuroscience and Medicine 4, INM-4, Medical Imaging Physics, Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Jülich, Germany; p.lohmann@fz-juelich.de (P.L.); n.j.shah@fz-juelich.de (N.J.S.); k.j.langen@fz-juelich.de (K.-J.L.)

³ Institute of Neuroscience and Medicine 11, INM-11, JARA, Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Jülich, Germany

⁴ JARA - Brain - Translational Medicine, 52074 Aachen, Germany

⁵ Department of Neurology, RWTH Aachen University, 52062 Aachen, Germany

⁶ Department of Nuclear Medicine, RWTH Aachen University, 52062 Aachen, Germany

⁷ Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

* Correspondence: d.willbold@fz-juelich.de (D.W.); a.willuweit@fz-juelich.de (A.W.); j.kutzsche@fz-juelich.de (J.K.); Tel.: +49-2461-619496 (J.K.)

S1 Methods

S1.1 Ethical approval

Commissioned by the Forschungszentrum Jülich a study was performed with the contract research organisation PsychoGenics Inc. (Tarrytown, NY, USA) in accordance with PsychoGenics' Standard Operating Procedures. Procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Integrity of the data was ensured through a quality control process.

S1.2 Animals

The double transgenic APP^{swE+PS1/M146L} (APP/PS1) AD mouse model, introduced by *Holcomb et al.* in 1998 [73], were bred at PsychoGenics Inc. (Tarrytown, NY, USA). Mice were housed in mixed-genotype and treatment groups of four female mice in a controlled environment (12/12 h light/dark cycle, humidity maintained around 50% and a room temperature between 20 °C and 23 °C). Food and water was available *ad libitum*.

S1.3 Treatment

Seven-months aged female APP/PS1 mice and their non-transgenic littermates (ntg) were treated intraperitoneally using the same procedure as described previously in the manuscript. AD mice were again treated with 10 mg per minipump equalling 14 mg/kg/d RD2RD2 (n = 15) or with physiological saline at pH 7.0 (placebo n = 15 and as control group ntg n = 13).

S1.4 Plasma and tissue collection

After four weeks of treatment, APP/PS1 and non-transgenic mice were deeply anaesthetised and monitored for loss of reflexes in which all the responses to external stimuli cease (verified by a toe pinch). The final collection of blood was done by terminal cardiac puncture. All blood samples were collected in K₂EDTA tubes and kept on ice for short-term storage. Within 15 min of blood collection, tubes were centrifuged for 10 min at 2.000 g in a refrigerated centrifuge. The supernatant (plasma) was extracted using a pipette and transferred into pre-labelled tubes. Samples were stored at -80 °C.

Following blood collections, brains of APP/PS1 and non-transgenic mice were harvested and post-immersion fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4 at 4 °C for three days. Brains were cut sagittally in 40 µm sections using a vibratome (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany). Sections were stored in cryoprotective media (PBS with 30% ethylene glycol, 30% glycerol) until further processing.

Citation: Post, J.; Kogel, V.; Schaffrath, A.; Lohmann, P.; Shah, N.J.; Langen, K.-J.; Willbold, D.; Willuweit, A.; Kutzsche, J. A Novel Anti-Inflammatory D-Peptide Inhibits Disease Phenotype Progression in an ALS Mouse Model. *Molecules* **2021**, *26*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Fernanda Borges

Received: 22 January 2021

Accepted: 11 March 2021

Published: 13 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

S1.5 Cytokine assay

Plasma samples from the transgenic APP/PS1 mice were measured using a Bio-Plex MAP kit (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA). PsychoGenics Inc. (Tarrytown, NY, USA) carried out the measurement of the plasma samples of transgenic APP/PS1 mice (RD2RD2 $n = 15$ and placebo $n = 15$). The assay was performed according to manufacturer's protocol. The plasma samples were examined for seven specific inflammation markers: interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), interleukin-12 heterodimer p70 (IL-12p70), interferon gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and the C-X-C motif ligand 1 (CXCL1). In general, values below the limit of detection (LoD) were excluded from analysis. Inflammatory marker data were presented as picograms per millilitre (pg/mL).

S1.7 Immunohistochemical staining

Gliosis (ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) antibody for microglia and glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody for astrocytes) of eight months old APP/PS1 mice was assessed by immunohistochemical analysis. Immunolabelling was performed on free-floating sections. The sections were rinsed in PBS and incubated in 1% Triton X-100, 10% H₂O₂ in PBS for 20 min at RT. After another PBS rinse, sections were blocked in 10% normal horse serum in PBS for 1 h at RT. Primary antibodies were solved in PBS (anti-Iba1, 1:500, Abcam, Cambridge, UK; anti-GFAP, 1:2000, DAKO Agilent Technologies, Santa Clara, USA) and brain sections were incubated overnight at 4°C in a humid chamber.

Afterward, immunolabelled sections with GFAP and Iba1 antibody were rinsed and incubated with biotinylated secondary anti-mouse antibody (1:1000 in PBST with 1% BSA (Sigma Aldrich, Germany)) for 2 h at RT followed by 3, 3'-Diaminobenzidine. Immunohistochemical sections were mounted with DPX Mountant medium (Sigma Aldrich, Germany) after washing in an ascending alcohol series.

S1.8 Quantification

Immunolabelled sections with GFAP and Iba1 of APP/PS1 mice were analysed with a digital Olympus BX50 microscope (Olympus America Inc., Center Valley, USA). Histopathology analyses in APP/PS1 were carried out in the hippocampus and cortex region of the brain (ntg $n = 4$, RD2RD2 $n = 8$ and placebo $n = 8$). A total of three sections (4 images per section) were analysed with ImageJ (NIH) to estimate the immunoreactive area of microglial cells per unit (mm²) by Iba1 and GFAP immunoreactivity (astrogliosis) as optical density (OD) [71, 74, 75].

S1.9 Phenotype assessment

In our pilot study, four weeks aged SOD1*G93A (B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J) mice and their non-transgenic littermates were tested in different behavioural set ups. For phenotype assessment, the SHIRPA test battery and the modified pole test were performed as described in the method section of the manuscript.

S1.10 Statistics

Statistical analysis were performed using SigmaPlot Version 11 (Systat Software, Germany). GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., USA) was used for the graphic illustrations. Presentation of data as mean $\pm$ SEM (behavioural tests, histochemical and biochemical analysis), $p > 0.05$ was considered as not significant (ns). Normal distribution of data was tested by use of Shapiro-Wilk normality test (SigmaPlot Version 11, Systat Software, Germany). One-way measurement ANOVA with LSD post hoc analysis was used to analyse the results of the histochemical analysis (quantification of APP/PS1 samples), biochemical analysis (cytokine assay of APP/PS1 samples) and behavioural tests of SOD1*G93A mice (SHIRPA test and modified pole test).

S2 Figures

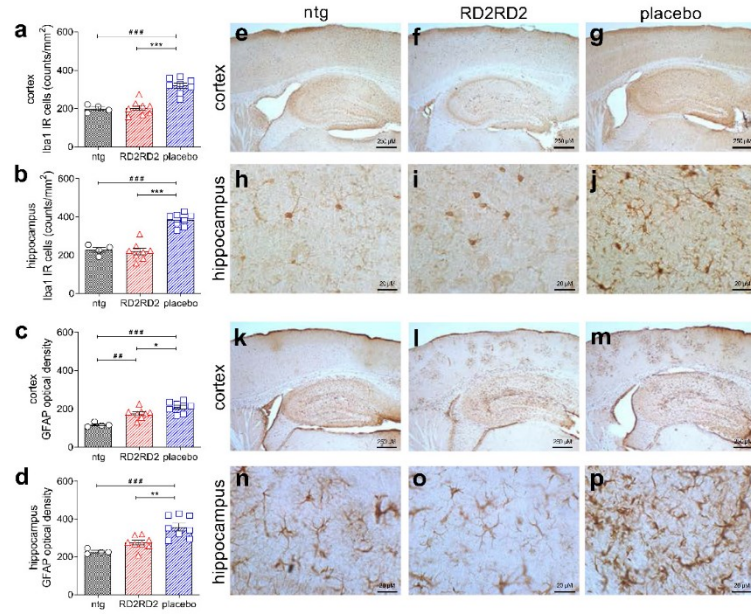


Figure S1. Analysis of neuroinflammation in cortex and hippocampus of RD2RD2-treated APP/PS1 mice. Treatment with RD2RD2 significantly reduced both the number of activated microglia (antibody Iba1) and of activated astrocytes (antibody GFAP) in the cortex and hippocampus of APP/PS1 mice. Presentation of the analysed cells and brain regions are given on the right (microglia: **a**, **e-g** = cortex and **b**, **h-j** = hippocampus; astrocytes: **c**, **k-m** = cortex and **d**, **n-p** = hippocampus). Data is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were conducted by one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis, ntg $n = 4$, RD2RD2 $n = 8$ and placebo $n = 8$. Lozenges (*) and asterisks (*) indicate a significance between treatment groups (ntg vs RD2RD2 or ntg vs placebo: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and RD2RD2 vs placebo: * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p < 0.001$). IR: immunoreactivity. Circles: placebo-treated ntg; triangles: RD2RD2-treated SOD1*G93A mice and squares: placebo-treated SOD1*G93A mice.

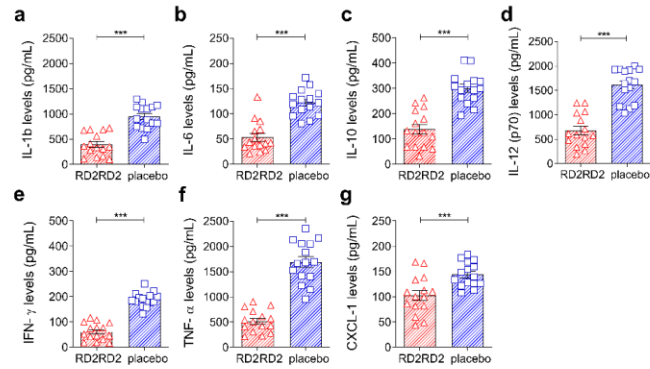


Figure S2. Treatment with RD2RD2 significantly reduced levels of inflammatory markers in the plasma of APP/PS1 mice. A Bio-Plex Map kit was used to analyse a possible change of inflammatory cytokines at the end of the study. Data revealed a significant reduction in all cytokines due to RD2RD2 treatment in comparison to placebo treatment (**a-g**). Cytokine concentrations are given in picogram per milliliter (pg/mL). Data is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were conducted by one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis, RD2RD2 n = 15 and placebo n = 15 for each cytokine. Asterisks (*) indicate a significance between treatment groups (RD2RD2 vs placebo: *** p < 0.001). Circles: placebo-treated ntg; triangles: RD2RD2-treated SOD1*G93A mice and squares: placebo-treated SOD1*G93A mice.

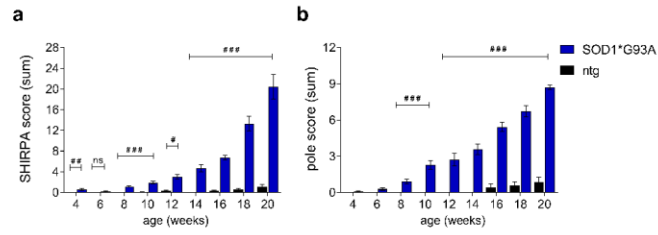


Figure S3. Phenotype assessment of SOD1*G93A mice and their non-transgenic littermates. The SHIRPA test battery (**a**) and the modified pole test (**b**) were used to evaluate the phenotypic development of SOD1*G93A mice. Four weeks aged mice were tested regularly every second week up to an age of 20 weeks. At an age of 10 weeks seven animals of each group went into analysis of hind limb muscles and the phenotype assessments went on with the remaining seven animals. Data is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were conducted by one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis, ntg n = 14 and SOD1*G93A n = 14 (weeks 4 to 10) and ntg n = 7 and SOD1*G93A n = 7 (weeks 12 to 20).

S3 Tables

Table S1. Treatment with RD2RD2 significantly reduced gliosis in APP/PS1 mice. Analysis of activated glia cells in AD mice indicate a significant change in the neuroinflammatory pathology after intraperitoneal treatment with RD2RD2 compared to placebo-treated mice. Data is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were conducted by one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis. Lozenges (*) and asterisks (*) indicate a significance between treatment groups (ntg vs RD2RD2 or ntg vs placebo: *** $p < 0.001$ and RD2RD2 vs placebo: * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p < 0.001$). IR: immunoreactivity, OD: optical density

IR	Area	ntg	RD2RD2	placebo	Statistic (one-way ANOVA Analysis of Variance)
Iba1 (counts)	cortex	228	203	320	$F(2,17) = 25.57, p < 0.001$
		± 13.4	$\pm 13.2^{***}$	$\pm 14.1^{***}$	ntg vs RD2RD2 $p = 0.876$ (ns)
					ntg vs placebo $p < 0.001$
	hippocampus				RD2RD2 vs placebo $p < 0.001$
		200	220	383	$F(2,17) = 42.28, p < 0.001$
		± 9.92	$\pm 16.2^{***}$	$\pm 12.1^{***}$	ntg vs RD2RD2 $p = 0.722$ (ns)
GFAP (OD)	cortex				ntg vs placebo $p < 0.001$
					RD2RD2 vs placebo $p < 0.001$
		117	176	208	$F(2,17) = 17.04, p < 0.001$
	hippocampus	± 5.66	$\pm 9.66^{***,*}$	$\pm 9.92^{***}$	ntg vs RD2RD2 $p = 0.002$
					ntg vs placebo $p < 0.001$
					RD2RD2 vs placebo $p = 0.021$
	cortex				$F(2,17) = 13.70, p < 0.001$
		228	275	357	ntg vs RD2RD2 $p = 0.097$ (ns)
		± 6.29	$\pm 12.4^{**}$	$\pm 20.5^{***}$	ntg vs placebo $p < 0.001$
	hippocampus				RD2RD2 vs placebo $p = 0.001$

Table S2. Cytokine assay of RD2RD2- and placebo-treated APP/PS1 mice. A Bio-Plex Map kit was used to analyse a possible change of inflammatory cytokines at the end of the study. Treatment with RD2RD2 significantly reduced levels of inflammatory markers in the blood of APP/PS1 mice. Cytokine concentrations are given in picogram per milliliter (pg/mL). Data is presented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were conducted by one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis, RD2RD2 n = 15 and placebo n = 15 for each cytokine. Asterisks (*) indicate a significance between treatment groups (RD2RD2 vs placebo: *** p < 0.001).

Marker (pg/mL)	RD2RD2	placebo	Statistic (one-way ANOVA Analysis of Variance)
IL-1 β	394 $\pm$ 57.6 ***	950 $\pm$ 60.4	F(1,28) = 44.52, p < 0.001 RD2RD2 vs placebo p < 0.001
IL-6	53.6 $\pm$ 7.87 ***	122 $\pm$ 6.75	F(1,28) = 43.46, p < 0.001 RD2RD2 vs placebo p < 0.001
IL-10	139 $\pm$ 18.9 ***	300 $\pm$ 16	F(1,28) = 42.74, p < 0.001 RD2RD2 vs placebo p < 0.001
IL-12p70	677 $\pm$ 88.5 ***	1612 $\pm$ 87.3	F(1,28) = 56.55, p < 0.001 RD2RD2 vs placebo p < 0.001
INF- γ	61 $\pm$ 8.87 ***	189 $\pm$ 7.34	F(1,28) = 123.56, p < 0.001 RD2RD2 vs placebo p < 0.001
CXCL-1	103 $\pm$ 9.79 ***	144 $\pm$ 6.25	F(1,28) = 12.79, p = 0.001 RD2RD2 vs placebo p = 0.001
TNF- α	517 $\pm$ 57.3 ***	1689 $\pm$ 107	F(1,28) = 93.32, p < 0.001 RD2RD2 vs placebo p < 0.001

S4 References

71. Ferreira, T. & Rasband, W. The Image J User Guide. **2011**.
73. Holcomb, L. et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat. Med.* **1998**, 4, 97-100, 10.1038/nm0198-097.
74. Webster, B. et al. Astroglial Activation of Extracellular-Regulated Kinase in Early Stages of Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2006**, 65, 142-151, 10.1097/01.jnen.0000199599.63204.6f.
75. Hwang, I. K. et al. Changes in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the dentate gyrus and hippocampus proper of adult and aged dogs. *J Vet Med Sci* **2008**, 70, 965-969, 10.1292/jvms.70.965.

3.2 Oral treatment with RD2RD2 impedes development of motoric phenotype and delays symptom onset in SOD1*G93A transgenic mice

Autoren: Post J, Schaffrath A, Gering I, Hartwig S, Lehr S, Shah NJ, Langen K-J, Willbold D, Kutzsche J and Willuweit A

Journal: Scientific Reports

Status: in Revision 23.03.2021

Impact Factor: 3.998 (2019)

Beitrag: Planung der ALS-Studie

Durchführung und Analyse aller Verhaltensversuche (ALS)
(Körpergewicht, SHIRPA-Test, modifizierter Stabtest,
Greifstärketest, Spreizreflextest der Hinterbeine,
Krankheitsprogression)

Herstellung der Gelatinedrops und Behandlung der ALS-Mäuse

Durchführung der immunhistologischen Experimente
(Mikrogliazellen und Neurone im Gehirn und Rückenmark)

Quantifizierung der immunhistologischen Ergebnisse

Vorbereitung und Auswertung der biochemischen Analyse

Anfertigung aller Abbildungen

Analyse und statistische Auswertung aller Daten

Hauptverfassung und Prüfung des Manuskriptes

Title Page

Oral treatment with RD2RD2 impedes development of motoric phenotype and delays symptom onset in SOD1^{G93A} transgenic mice

5 Julia Post¹, Anja Schaffrath¹, Ian Gering¹, Sonja Hartwig², Stefan Lehr^{2,3}, N. Jon Shah^{4,5,6,7}, Karl-Josef Langen^{4,8}, Dieter Willbold^{1,9*}, Janine Kutzsche^{1*}, Antje Willuweit^{4*}

Affiliations

¹*Institute of Biological Information Processing, Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany*

10 ²*Institute of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, German Diabetes Center (DDZ) at the Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Leibniz Center for Diabetes Research, Düsseldorf, Germany*

³*German Center for Diabetes Research (DZD), Neuherberg, Germany*

⁴*Institute of Neuroscience and Medicine, Medical Imaging Physics (INM-4), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany*

15 ⁵*Institute of Neuroscience and Medicine 11, INM-11, JARA, Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany*

⁶*JARA - Brain - Translational Medicine, Aachen, Germany*

⁷*Department of Neurology, RWTH Aachen University, Aachen, Germany*

⁸*Department of Nuclear Medicine, RWTH Aachen University, Aachen, Germany*

⁹*Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany*

20 * Correspondence to:

Antje Willuweit

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institute of Neuroscience and Medicine, Medical Imaging Physics (INM-4)
52425 Jülich, Germany
25 e-mail: a.willuweit@fz-juelich.de
phone: +49-2461-6196358
fax: +49-2461-612302
and

Janine Kutzsche

30 Forschungszentrum Jülich GmbH
Institute of Biological Information Processing, Structural Biochemistry (IBI-7)
52425 Jülich, Germany
e-mail: j.kutzsche@fz-juelich.de
phone: +49-2461-619496
35 fax: +49-2461-619497
and

Dieter Willbold

40 Forschungszentrum Jülich GmbH
Institute of Biological Information Processing, Structural Biochemistry (IBI-7)
52425 Jülich, Germany
e-mail: d.willbold@fz-juelich.de
phone: +49-2461-612100
fax: +49-2461-612023

45 Abstract

Neuroinflammation is a pathological hallmark of several neurodegenerative disorders and plays a key role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). It has been implicated as driver of disease progression and is observed in ALS patients, as well as in the transgenic SOD1^{G93A} mouse model. Here, we explore and validate the therapeutic potential of the D-enantiomeric peptide RD2RD2 upon oral administration in SOD1^{G93A} mice. Treatment resulted in a significantly increased performance in behavioural and motor coordination tests and a decelerated neurodegenerative phenotype in RD2RD2-treated SOD1^{G93A} mice. Additionally, we observed retardation of the average disease onset. Treatment of SOD1^{G93A} mice led to significant reduction in glial cell activation and a rescue of neurons. Analysis of plasma revealed normalisation of several cytokines in samples of RD2RD2-treated SOD1^{G93A} mice towards the levels of non-transgenic mice. In conclusion, these findings qualify RD2RD2 to be considered for further development and testing towards a disease modifying ALS treatment.

Keywords

60 amyotrophic lateral sclerosis; behaviour; motor coordination; plasma cytokines; D-enantiomeric peptide; neuroinflammation; SOD1^{G93A}

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterised by a progressive motor neuron loss in the central nervous systems. Clinically, ALS leads to focal muscular weakness, with atrophy of skeletal muscles up to progressive paralysis and premature death, usually from respiratory failure, generally in 3 to 5 years after diagnosis [1-3]. Most of ALS cases are sporadic (sALS), while about 10% of the cases are inherited by familial ALS (fALS) [4, 5]. More than 150 gene mutations have been reported to be potentially involved in ALS, including 27 which are rated disease-relevant based on strong evidence (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/als>). Mutations in the gene of the Cu/Zn-superoxide dismutase 1 (SOD1) are a common cause of fALS [6, 7] and are identified in up to 3 % of sALS cases [8-11]. Both fALS and sALS produce similar clinical and pathological features, which supports the strategy of using laboratory models of fALS SOD1 mutations in preclinical studies to understand disease pathogenesis and to identify potential therapeutic targets for both forms of disease [12-15]. In 1994, a transgenic mouse model was created (tg(SOD1^{G93A})1Gur), which expresses the mutated human SOD1 gene (SOD1^{G93A}) [16, 17]. These transgenic mice develop many key features of human clinical signs and pathology of human ALS, including motor neuron degeneration, paralysis and shortened life-span [18, 19].

Interestingly, the role of neuroinflammation and immune-inflammatory processes in mutant
80 SOD1-mediated ALS was recognised late, but is now established as an important aspect in
human cases and transgenic SOD1^{G93A} mice [20-25]. The activation of glial cells in the brain
stem and spinal cord is a characteristic hallmark of neuroinflammation in ALS. Especially
astrogliosis and activated microglia play a role in disease progression and are considered as
indicators during advancement of the disease [26-28]. In response to glia cell activation,
85 inflammatory mediators are secreted, e.g. cytokines. Classified into two different types (pro-
and anti-inflammatory), cytokines are involved in complex signalling cascades. Pro- and anti-
inflammatory cytokines are secreted in unequal levels depending on disease stage [29, 30].
Although, many potential targets have been identified and new therapeutics were tested in
animal studies and clinical trials, to date there is no curative therapy for ALS present [31, 32].
90 Thus far, only symptomatic treatments are available and minor effects on life prolongation have
been achieved [33, 34].

A relatively new class of promising drug candidates are the all-D-peptides, which consist solely
of D-enantiomeric amino acid residues and which exhibit several advantages including low
immunogenicity and high proteolytic stability [35-37]. Recently, the excellent safety and
95 tolerability of an all-D-peptide drug candidate could be demonstrated in a clinical phase I trial
[38] after demonstrating its preclinical efficacy in several Alzheimer's disease mouse models
[39-41]. The drug candidate, called RD2, binds preferentially amyloid beta (A β) monomers with
nanomolar affinity and stabilizes A β in its native conformation [42]. The rationale for developing
a head-to-tail tandem version of RD2, RD2RD2, was to obtain a bivalent version of RD2 with
100 potentially higher avidity and affinity for polyvalent A β assemblies, like A β oligomers. However,
RD2RD2 was not significantly efficient neither on amyloid load, soluble and insoluble A β nor
on cognitive deficits [43]. Instead, RD2RD2 demonstrated remarkable anti-inflammatory
effects by reducing neuroinflammation in an Alzheimer's disease mouse model [44].

Based on these results, we intended to characterise the therapeutic potential of RD2RD2 in
105 an additional mouse model linked to neuroinflammation and chose the ALS SOD1^{G93A}
transgenic mouse model. In a previous study with intraperitoneal treatment of 12 weeks old
transgenic SOD1^{G93A} mice, RD2RD2 inhibited disease phenotype progression and
demonstrated anti-inflammatory effects by reducing neuroinflammation [44].

To further investigate the general therapeutic potential of RD2RD2 especially after oral
110 administration, we initiated a treatment study with oral application of RD2RD2 in SOD1^{G93A}
transgenic mice. The efficacy of the treatment was investigated by analysis of disease
phenotype in the mice as well as various behavioural and motor coordination tests.
Neuroinflammation was assessed in tissue samples of the brain stem and lumbar spinal cord
and by analysis of plasma cytokine levels.

115

Methods

Animals

Male mice of the congenic B6.Cg-Tg(SOD1^{G93A})1Gur/J line, which was backcrossed for at least 10 generations to C57Bl/6J, were purchased from JAX (Stock No. 004435, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA). Male mice were bred in-house with C57Bl/6J females obtained from CRIVER (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany). Mating generated hemizygous SOD1^{G93A} transgenic mice and non-transgenic littermate (ntg) controls. Progenies were genotyped for presence of the human SOD1 gene by a quantitative PCR assay of DNA obtained from ear markings, as previously described [45]. Copy numbers of the transgene were checked by calculation of the delta cycle threshold (ΔCT) = $CT_{\text{internal control}} - CT_{\text{gene of interest}}$. Female SOD1^{G93A} mice with a high copy number of the transgene were selected for stratified randomisation into equal groups. As control, the genotype of each animal was confirmed by a second quantitative PCR at the end of the study. Housing of the animals was under the same terms at the animal facility of the Forschungszentrum Jülich as described previously [46]. Mice were housed in mixed-genotype in a controlled environment (12/12 h light/dark cycle, humidity maintained around 50 % and a room temperature between 20 °C and 23 °C). Food and water was available *ad libitum*. All animal experiments at the Forschungszentrum Jülich were performed in accordance with the German Law on the protection of animals (TierSchG §§ 7-9) and with permit from the local authority (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV), North Rhine-Westphalia, Germany; reference number: AZ 84-02.04.2015.A106 and AZ 84-02.04.2014.A423).

Drug candidate

RD2RD2 was purchased from Cambridge Peptides (Cambridge Peptides, Birmingham, United Kingdom) as lyophilized powder. The peptide consists of 24 D-enantiomeric amino acid residues with its C-terminus being amidated (sequence: ptilhthnrrrrrptilhthnrrrrr, 3.2 kDa).

Study design

Female SOD1^{G93A} mice were treated daily *per oral* (p.o.) with 50 mg/kg RD2RD2 or placebo (drinking water) formulated in tailor-made jellies as described in the section below. The RD2RD2 dosage was chosen based on successful former experiments with related compounds, taking the difference in molecular weight into account [41]. The RD2RD2 amount in the jellies was adjusted based on the weekly determined average body weights of the mice. The cohort of animals contained 42 female mice assigned into three experimental groups consisting of SOD1^{G93A} mice (RD2RD2 n = 14 and placebo n = 14) and a control group of non-transgenic littermates (ntg n = 14). All animal born within one week were stratified into the treatment groups according to gene copy numbers and results of behavioural tests (SHIRPA

test and pole test) at baseline. Each mouse was treated for 68 days and the average age at treatment initiation was 53 days $\pm$ 2 days.

The anticipated treatment start was based on a previous pilot study in which transgenic SOD1^{G93A} mice were compared to their wild type littermates from week 4 until week 20 of age.

155 Using the modified pole test, first measurable deficits in motor performance of transgenic mice were detected at an age of 8 weeks [44]. According to the criteria of *Ohgomori et al.* (2017) [45], the current study was designed to start in the pre-symptomatic phase, before first deficits are visible (7 weeks of age).

160 In regular intervals, SOD1^{G93A} mice and their non-transgenic littermates were tested in different behavioural set ups (SHIRPA test battery, pole test, grip strength test and splay reflex test of hind limbs) starting before treatment (baseline measurements). The stratified randomisation of the transgenic mice into two equal groups based on the following criteria: Δ CT and baseline measurement of the SHIRPA and pole test. All tests were carried out at the same time of the day and all mice were habituated in single cages before starting the particular tests. Mice were
165 observed daily for disease progression. At the end of the study, blood and tissue samples were collected of the SOD1^{G93A} and non-transgenic mice. Blood samples were centrifuged and the supernatant (plasma) was stored at - 80 °C. Following blood collections, brains and spinal cords of SOD1^{G93A} and non-transgenic mice were harvested and histologically analysed for gliosis (using an integrin α -M/ β -2 (CD11b) antibody for activated microglia and glial fibrillary
170 acidic protein (GFAP) for activated astrocytes) and neurodegeneration (using an antibody against neuronal nuclear proteins (NeuN) for mature neurons and a choline acetyltransferase (ChAT) antibody for motor neurons). Plasma samples were biochemically analysed for several inflammatory markers using a multiplex immunoassay.

175 Treatment

Jellies used for oral treatment consisted of 19 % instant gelatin (Dr. Oetker, Bielefeld, Germany), 30 % sucrose and 10 % sucralose. To produce drops, the components were solved in the regular drinking water of the mice. In order to produce jellies of suitable size, a 96-well plate was filled with the mixture. Before the gelatin solidified, 50 μ L of RD2RD2-solution or
180 drinking water (placebo) was added to each well. The total volume of one jelly was 200 μ L. Jellies were stored at 4°C until further use on the next days. For feeding, mice were placed individually in a clean cage with a jelly. In general, the mice ate the drop within a few minutes. The experimenter ensured that the jelly was eaten before placing the mice back in their home cage. Mice were trained to eat the jelly in preparation of the experiment. The stability of
185 RD2RD2 in jellies was demonstrated by analyzing the concentration of RD2RD2 in freshly formulated and 6 days-old jellies (supplemental figure S1). Mice were fed with the same batch of freshly produced jellies for a maximum of 6 days.

Body weight of SOD1^{G93A}

190 The weight of the SOD1^{G93A} animals was recorded at least three times per week beginning prior to baseline measurements. At disease onset, the animals body weight was controlled daily. Body weight was taken always prior to treatment between 7 a.m. and 8 a.m. to avoid diurnal variations.

SHIRPA phenotype assessment

195 The SHIRPA primary screen comprises a test battery of reflex and sensorimotor tests for behavioural assessment of mouse phenotype [47, 48]. This test consisted of several subtests: restlessness, alertness, startle response, pinna reflex, corneal reflex, touch response, pain response, grooming, and apathy, abnormal body carriage, abnormal gait, loss of righting reflex, forelimb placing reflex, hanging behaviour, hind limb tremor. Assessment of each mice began with observation of undisturbed behaviour in habitual environmental followed by testing the
200 motor abilities in an arena of 42.5 cm x 18.0 cm x 26.5 cm (L x H x W). Lastly, a sequence of manipulations were used to measure body tone and reflexes. Scoring was defined from 0 (similar to ntg littermates) to 3 (extremely abnormal from ntg littermates). The sum of scores of all subtests per animal was used for analysis. Especially for this mouse model, the last seven tests mentioned above are additionally summed up to a motor score.

205 Modified pole test

Here, a slightly modified version of the standard pole test [49, 50] was used to detect early changes in the motor performance of the SOD1^{G93A} mice. The following modifications were realised: Mice were placed head downwards instead of upwards on a vertical pole (height 50 cm, diameter 1.2 cm, rough-surfaced) and their movement downwards was rated (0 continuous
210 run, 1 part-way runs, 2 slipping downwards and 3 falling down). Each animal was tested three times and the sum of all three scores was used for analysis.

Grip strength test

Grip strength analysis of the hind limbs was evaluated using a Grip Strength Meter (Ugo Basile Srl, Comerio VA, Italy). Following the manufacturers protocol, mice were placed with all four
215 limbs to a blind top grasping grid for hind limb measurements. The mice were pulled backwards by the tail and they grip intuitively after the grid. Because of the blind top in the front only the hind limb force was measured. The peak force was calculated three times in succession. The mean value of all three peak forces was used for analysis.

Splay reflex test of hind limbs

220 To characterise motor deficits, mice were suspended up by the tail and the extent of hind limb splaying was assessed for 15 s. A healthy splay of both hind limbs similar to that observed in

non-transgenic mice was given a score of 0. An acute splay angle or "weak splay" of both hind limbs received a score of 1. A single leg splay was assigned a score of 2. A mouse that exhibited no splay or pulled both hind limbs together, effectively crossing one over the other, was given a score of 3. This procedure was performed three times and the sum of all three scores was used for analysis.

Disease onset analysis

To monitor the disease progression of the SOD1^{G93A} mice, all animals were inspected daily for signs of motor deficits. Disease onset was determined after *Mead et al.* [51] if the following criteria were both met: "Point at which defects in hind limb splay and enhanced tremor were observed with a score of at least 1 in each category".

Plasma and tissue collection

Mice were deeply anaesthetised by inhalation with isoflurane (1.5 - 3.0 vol% in oxygen) and monitored for loss of reflexes in which all the responses to external stimuli cease (verified by a toe pinch). The final collection of blood was done by terminal cardiac puncture. All blood samples were collected in K₂EDTA tubes and centrifuged for 10 min at 2.000 g in a cooled centrifuge. The supernatant (plasma) was transferred into pre-labelled tubes. Following blood collections, brains and spinal cords were removed. Brain samples were divided into the two hemispheres and spinal cords transversally before both hemispheres and lumbar spinal cord samples were snap frozen in isopentane. All samples were stored at - 80°C.

Immunohistochemistry

The left-brain hemisphere and the lumbar spinal cord (L1-L5 tract) were cut for immunohistological analysis using a cryotome (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany). Immunohistochemistry (IHC) was performed on 20 µm sagittal frozen brain sections and on 12 µm transverse lumbar spinal cord sections (L1-L5 tract) of. The brain and lumbar region of the spinal cord were identified as described previously [52-54]. To avoid differences in staining intensity, which might affect measurements, every staining session was performed in one batch. Gliosis of astrocytes and microglia (antibodies GFAP and CD11b) was assessed in SOD1^{G93A} mice and their non-transgenic littermates. Furthermore, SOD1^{G93A} mice were investigated for mature neurons (antibody NeuN) and motor neurons (antibody ChAT) in the brain. Tissue sections were thawed and fixed with 4°C pre-cooled 4% paraformaldehyde for 10 min and followed by an antigen retrieval with 70% formic acid for 10 min. The sections were rinsed and elimination of endogenous peroxidases was ensured by incubation in 3% H₂O₂ in methanol for 15 min. After a further washing step, sections were incubated with the primary antibody overnight at 4°C in a humid chamber (GFAP: DAKO Agilent Technologies, Santa Clara, USA; NeuN: Merck Millipore, Darmstadt, Germany; ChAT: Novus Biologicals Europe,

Abingdon, United Kingdom) or for two hours at room temperature (CD11b: Abcam, Cambridge, United Kingdom). Primary antibodies were diluted 1:1000 in tris buffered saline with 1% Triton X-100 (TBST) with 1% bovine serum albumin (BSA) (GFAP and NeuN), 1:2000 in tris buffered saline (TBS) with 1% BSA (CD11b) or 1:1000 in phosphate buffered saline with 0.25% Triton X-100 (PBST) with 1% BSA (ChAT). Afterward, sections of SOD1^{G93A} mice were rinsed and incubated with biotinylated secondary anti-mouse, anti-rabbit or anti-donkey antibody (1:1000 in TBST with 1% BSA (NeuN and GFAP), 1:1000 in TBS with 1% BSA (CD11b) or in PBST with 1% BSA (ChAT), Sigma Aldrich, Germany) for two hours at room temperature followed by 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) enhanced with saturated nickel ammonium sulfate solution. Immunohistochemical sections were washed in an ascending alcohol series (in following order 70% EtOH, 90% EtOH and 100% EtOH for 5 min) and mounted with DPX Mountant medium (Sigma Aldrich, Germany).

Quantification

Images of SOD1^{G93A} sections were taken with a LMD6000 microscope (Leica Camera, Germany) and the respective software (LAS 4.0 software). All slides were acquired in one microscopy session. Quantification was performed with ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, USA) and CellProfiler Analyst (Broad Institute, Boston, USA) [55]. Immunoreactive microglial cells (antibody CD11b) and astrogliosis (antibody GFAP) were determined as percentage area (%) of the neuropil occupied by GFAP or CD11b and neuronal nuclei (antibody NeuN) and motor neurons (antibody ChAT) as count per stained area. To avoid deviations in the analysis of the region of interest, a standard circle or rectangle was created with the ImageJ program. CD11b immunoreactive area was analysed in the brain stem and lumbar spinal cord (ntg n = 10 to 14, placebo n = 9 to 14, RD2RD2 n = 10 to 14). GFAP immunoreactive area was analysed in the brain stem and lumbar spinal cord (ntg n = 10 to 12, placebo n = 10 to 14, RD2RD2 n = 10 to 13). NeuN counts were analysed in the brain stem and motor cortex layers 2/3 and 5 (ntg n = 10, placebo n = 10 to 14, RD2RD2 n = 9 to 14). ChAT counts were analysed in the brain stem and motor cortex layers 2/3 and 5 (ntg n = 11, placebo n = 11, RD2RD2 n = 11). In general, 6 brain slices and 8 lumbar spinal cord slices per mouse were used for each quantification. Animals with three or less quantifiable brain slices were excluded from analysis, as well as animals with four or less quantifiable spinal cord samples.

Cytokine assay

Plasma samples were measured using a multiplex immunoassay (Bio-Plex Pro Mouse Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Assays, 23-plex, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). The measurement of the plasma samples of transgenic SOD1^{G93A} mice (placebo n = 11 and

RD2RD2 n = 11) and their non-transgenic littermates (ntg n = 7) was performed according to manufacturer's protocol. In general, values below the limit of detection (LoD) were excluded from analysis. The plasma samples were tested for several interleukins (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40 and IL-17), interferon- γ (INF- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and several chemokines (C-C motif chemokine ligand (CCL-2 and CCL-5) and C-X-C motif chemokine ligand (CXCL-1). Data corresponded to the concentration ranges of the multiplex immunoassay. Cytokine concentrations are given in picogram per milliliter (pg/mL).

Statistics

All statistical calculations were performed using InVivoStat (Version 3.4.0.0, United Kingdom) or SigmaPlot (Systat Software, Version 11, Germany). GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., USA) was used for the graphic illustrations. Descriptive statistical analyses were calculated on all evaluated parameters. The data are given as means $\pm$ SEM. A p value > 0.05 was considered to be not statistically significant (ns). Normal distribution of data was either tested by use of Shapiro-Wilk normality test or by use of a normal probability plot (InVivoStat, Version 3.4.0.0, United Kingdom) [56]. Two-way repeated measurement (RM) ANOVA with Fisher's Least Significant Difference (LSD) post hoc analysis was used to analyse the results of the behavioural tests. One-way measurement ANOVA with Fisher's Least Significant Difference (LSD) post hoc analysis was used to analyse the results of the histochemical analysis and biochemical analysis. Statistical analysis of disease onset was performed using the Kaplan-Meier method with log rank test. The correlation between phenotype progression and levels of neuroinflammation or neurodegeneration were measured using Pearson's correlation coefficient.

Results

Oral treatment with RD2RD2 led to an amelioration of the SOD1^{G93A} phenotype.
SOD1^{G93A} transgenic mice and their non-transgenic littermates were administered a daily dose *per oral* (p.o.) of RD2RD2 (50 mg/kg) or placebo from 53 days $\pm$ 2 days of age for nine weeks of treatment.
Weight loss is a frequent feature of ALS and therefore, the body weight of mice was recorded beginning prior to baseline measurements. All mice gained body weight during treatment with placebo-treated transgenic mice showing the least gain of body weight, which became most apparent in the last treatment weeks (Fig. 1 A and B). At the end of the study, placebo-treated SOD1^{G93A} mice weighed significantly less than non-transgenic littermates.
The SHIRPA test battery was used to monitor the progression of the neurodegenerative phenotype of transgenic placebo- or RD2RD2-treated mice. After two weeks of treatment, first placebo-treated SOD1^{G93A} mice and one week delayed the RD2RD2-treated SOD1^{G93A} group

showed behavioural impairments compared to their non-transgenic littermates (Fig. 1 C). Treatment with RD2RD2 improved significantly the behavioural phenotype of SOD1^{G93A} mice vs placebo-treated littermates already three weeks after treatment start and thereafter (Fig. 1 C). While the behavioural deficits of placebo treated mice progressed steadily during the nine weeks treatment period, RD2RD2 treatment slowed down phenotype progression drastically. For additional investigation of the phenotype progression, parameters of the SHIRPA test were subdivided into a motor score (Fig. 1 D). After four weeks of treatment, motor deficits were significantly lower upon RD2RD2- vs placebo-treated SOD1^{G93A} mice (Fig. 1 D).

335 **RD2RD2 treatment improved motor performance and led to delay of the disease onset in SOD1^{G93A} mice.**

To measure motor deficits during disease progression, additional motor tests were carried out, i.e. pole test, grip strength and splay reflex test of hind limbs (Fig. 2 A to C). These tests detect functional deficits in early pathological motor defects in SOD1^{G93A} mice. Throughout the experiment, non-transgenic mice did not show any motor deficits, only slight but normal variability in their daily performance during this period. In contrast, transgenic SOD1^{G93A} mice developed significant deficits during the study on motor performance at different time-points. As early as three weeks after treatment start, RD2RD2-treated SOD1^{G93A} mice showed significant less impairment in pole performance and splay reflex test than placebo-treated littermates. Moreover, the efficacy of RD2RD2 in SOD1^{G93A} mice vs placebo-treated littermates was demonstrated starting after five weeks of treatment in the grip strength test.

Assessment of disease onset according to *Mead et al.* (2011) [51], i.e. defect in hind limb splay and tremor, was performed three times a week from the start of the experiment. First disease onset occurred at 86 days of age in placebo-treated mice (Fig. 2 D). Kaplan-Meier survival analysis revealed that the placebo group had a mean disease onset of 95 days (n = 14, range between 86 days ± 103 days), whereas RD2RD2-treated SOD1^{G93A} mice lived on average 106 days (n = 13, range between 94 days ± 113 days) without any symptoms. Log rank test was statistically significant (### p < 0.001), indicating a mean delay of disease symptoms of 11 days by RD2RD2 treatment in SOD1^{G93A} mice. One RD2RD2-treated SOD1^{G93A} mouse showed no tremor at all during the course of the treatment study (Fig. 2 D). Evidence of a changed hind limb splay or tremor was undetected at any stage in non-transgenic littermates. In general, RD2RD2-treated SOD1^{G93A} mice showed improved motor performance in comparison to placebo-treated littermates. All non-transgenic mice exhibited normal motor function throughout the experimental period.

360 **Reduced gliosis and neurodegeneration in RD2RD2-treated SOD1^{G93A} mice.**

During disease progression, SOD1^{G93A} mice are pathologically characterised by the presence of gliosis and neurodegeneration in brain and spinal cord, especially within the brain stem, motor cortex and the lumbar spinal cord [57-60]. Histopathological quantifications were carried out after nine weeks of oral treatment.

365 In general, quantification revealed less microgliosis in SOD1^{G93A} mice vs non-transgenic littermates (Fig. 3 A and B, Tab. S1). RD2RD2 treatment diminished the activation of microglia stained with antibody CD11b in the brain stem of SOD1^{G93A} mice in comparison to placebo-treated mice. The same trend was observed in the lumbar spinal cord, which did not reach statistical significance (Fig. 3 A and B, Tab. S1). In addition, the amount of GFAP-positive cells
370 in the brain stem of RD2RD2-treated SOD1^{G93A} mice was significantly less than in the placebo group (Fig. 3 C and D, Tab. S1).

To support the finding that RD2RD2-improved motor performance and delayed disease onset, we analysed the number of neuronal cells in the brain of SOD1^{G93A} mice. Neuronal changes were quantified by the number of NeuN-positive neurons in the brain stem and motor cortex of
375 SOD1^{G93A} mice and their non-transgenic littermates. Additionally, lower motor neurons of the brain stem were assessed by quantification with a ChAT-specific antibody. Placebo-treated mice displayed a significant loss of mature neurons in the brain stem and motor cortex (Fig. 3 E and F, Tab. S1), and in brain stem specifically a significant decrease of lower motor neurons in comparison to non-transgenic littermates (Fig. 3 G and H, Tab. S1). Treatment with RD2RD2
380 rescued the loss of total neurons in both the brain stem and motor cortex of SOD1^{G93A} mice to levels of non-transgenic littermates and, moreover, of motor neurons in the brain stem of RD2RD2-treated SOD1^{G93A} mice (Fig. 3 E to H and Tab. S1).

In order to assess whether there is a possible relationship between phenotype progression and levels of neuroinflammation or neurodegeneration, results of histological quantifications
385 were correlated with both, the SHIRPA score and the SHIRPA motor score of the last treatment week. The Pearson's correlation coefficients from each correlation are shown in Table S2.

Analysis over all three groups revealed a significant correlation of neuroinflammation with the SHIRPA score and, moreover, with the SHIRPA motor score (Fig. 4 A to D and Tab. S2, overall effect of ntg vs placebo SOD1^{G93A} vs RD2RD2 SOD1^{G93A}). The number of mature neurons
390 correlated significantly with the SHIRPA scores over all three groups (Fig. 4 E and F, Tab. S2) and specifically with the SHIRPA motor score (Fig. 4 F and Tab. S2).

RD2RD2 administration suppressed the activation of inflammatory plasma markers in SOD1^{G93A} mice.

395 To identify whether RD2RD2 modulates the general inflammatory status in transgenic SOD1^{G93A} mice, a multiplex immunoassay was used to analyse a possible change of plasma

cytokines at the end of the study. Analysis of the inflammatory marker levels revealed a significant up- or downregulation in several cytokines of placebo-treated SOD1^{G93A} mice vs non-transgenic littermates (Fig. 5 and Tab. S3; IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-13, IL-17, CCL-2 and CXCL-1). The RD2RD2-treated group lost significant changes of inflammatory markers in comparison to the non-transgenic (Fig. 5 A, C, D, I and Tab. S3; IL-1 β , IL-6, IL-10 and CCL-2) and gained differences to placebo-treated mice (Tab. S3). Generally, there was a trend of reversing the altered plasma levels of SOD1^{G93A} mice towards levels of non-transgenic littermates, reaching statistical significance in the following cytokines: IL-10, IL-13 and CCL-2.

405 Discussion

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is one of the most common, fatal and progressive neurodegenerative disease affecting the motor system [61]. Due to an ageing world population, there is an increasing incidence of ALS cases during the last decades [62]. Despite intensive research, the cause is still unknown and current treatment options are only symptomatic [34]. In addition to the clinical symptoms like motor deficits, an increasing evidence has firmly certified that the dysregulation of the immune system in ALS results in an extensive inflammatory response [63, 64]. Previous studies demonstrated the key role of neuroinflammation, mainly caused by microglia activation and astrogliosis [27, 65, 66]. In the early phase of disease, activated glial cells produce a protective immune response, while during the progression of the disease excessive glial expression is harmful and resulted in a neurotoxic response [23, 67]. Further, glia cell activation leads to changes in the production and release of inflammatory markers [25, 68, 69].

In the hereby described work, we examined the compound RD2RD2 for its therapeutic efficacy in ALS, a neurodegenerative, neuroinflammation-driven disease. RD2RD2 has been discovered in a screening campaign against A β and demonstrated remarkable anti-inflammatory effects by reducing neuroinflammation in an Alzheimer's disease mouse model [44]. Based on these findings, an *in vivo* study with RD2RD2 in an ALS specific mouse model was initiated to explore and validate the therapeutic potential of RD2RD2 when given orally to mice.

Seven weeks old SOD1^{G93A} mice and their non-transgenic littermates were treated daily with RD2RD2 or placebo, formulated in tailor-made jellies. Oral treatment was chosen as the route of administration because it is the least invasive application method and preferred route of administration in humans. The early stage of ALS in SOD1^{G93A} mice is characterised by neuroinflammation exhibiting a neuroprotective function. Progression of disease leads to a conversion into a neurotoxic reaction, which accelerates the process [70, 71]. Several research groups demonstrated time-dependent effects on neuroinflammation and disease progression in SOD1^{G93A} mice upon treatment with anti-inflammatory compounds [72-74]. Therefore, the

purpose of the current study was to investigate the therapeutic potential on ALS pathogenesis, when initial treatment starts in the early phase of ALS before symptom onset.

435 In this study, we were able to demonstrate an enhanced *in vivo* efficacy of RD2RD2. Placebo-treated SOD1^{G93A} mice showed a significant progression of the motor-neurodegenerative phenotype while RD2RD2 treatment in transgenic mice slowed down phenotype progression, especially during the first treatment weeks. Consistent with the results of the behavioural and motor coordination tests, RD2RD2-treatment significantly delayed disease onset in SOD1^{G93A}
440 mice. Thus, an early treatment was able to extend the time-span to disease onset between placebo- and RD2RD2-treated SOD1^{G93A} mice. Till the end of the behavioural experiments, the difference in phenotype and motor performance of RD2RD2- vs placebo-treated SOD1^{G93A} mice were significant.

Immunohistochemical investigations of gliosis in the brain stem and lumbar spinal cord
445 resulted in significant differences between transgenic and non-transgenic mice and correlated significantly with the neurodegenerative phenotype in the last treatment week. However, gliosis in the brain stem of RD2RD2-treated SOD1^{G93A} mice was lower than in placebo-treated littermates with a statistically significant difference. The data suggested that the treatment with RD2RD2 could significantly prevent accumulation of activated glia cells in the brain stem of
450 SOD1^{G93A} mice.

A defining feature of ALS is the fatal progression of neurodegeneration [65, 75]. Therefore, we stained mature neurons in the brain stem and motor cortex of all mice and revealed a significant survival of neurons in RD2RD2-treated SOD1^{G93A} mice vs the placebo-treated group. The density of mature neurons after RD2RD2 treatment was close to the level of non-
455 transgenic littermates, while neurodegeneration was significantly progressed in the brain stem and motor cortex of the placebo-treated mice. Based on these results, we assume that RD2RD2 has a neuroprotective effect in this mouse model of ALS not only on mature neurons, but also on the survival of motor neurons.

Additionally, plasma samples were examined with a multiplex immunoassay to figure out,
460 whether RD2RD2 treatment had an effect on inflammatory markers, such as cytokines and chemokines. Indeed, RD2RD2 administration normalised the levels of many inflammatory plasma markers in SOD1^{G93A} mice towards levels found in non-transgenic mice. Inflammatory markers reflect disease progression in human cases and the SOD1 mice of ALS and have important roles in both toxic and neuroprotective functions depending on the stage of disease
465 progression [29, 30, 76, 77].

RD2RD2 was able to slow down disease progression and shift disease onset of treated transgenic mice significantly when given in the pre-symptomatic phase of this animal model. However, from a clinical point of view a later treatment start is more relevant, as treatment of patients in almost all cases can only be started after the onset of symptoms. Based on the very

470 promising results of this study an additional study analysing the therapeutic potential in already
diseased mice and on survival is necessary to judge the full potential of this new compound.
Considering the pathogenic mechanism of ALS, RD2RD2 might be a good therapeutic
candidate for a disease modifying treatment in ALS. However, the exact mechanism of action
for RD2RD2 has not been elucidated yet. The anti-neuroinflammatory effect of RD2RD2 was
475 a coincidental finding as the compound was originally developed for an anti-amyloid β -oligomer
directed treatment strategy against Alzheimer's disease [43]. SOD1^{G93A} mice only secrete
endogenous murine amyloid β , which is not capable of forming aggregates [78]. Therefore, an
amyloid β -related mechanism of action for RD2RD2 is unlikely. Instead, an off-target effect of
RD2RD2 on a so far unknown target is suggested. Although neuroinflammation cannot trigger
480 ALS *per se*, activated central nervous system microglia and astrocytes, and immune cells of
the periphery, including the immune-modulating cytokines they release, are drivers of disease
progression. Not only activated microglia but also astroglia have been shown to exert
neurotoxic effects and induce ALS-like symptoms [79]. Accordingly, a direct effect of RD2RD2
on neuroinflammatory cells is able to explain its therapeutic efficacy in this study. The
485 underlying molecular mechanisms, however, need to be investigated in more detail in the
future.

Conclusion

In the hereby described work we examined the all-D-enantiomeric peptide RD2RD2 for its
therapeutic potential in an ALS mouse model. So far, the mechanism underlying and the direct
490 target of RD2RD2 are still unknown. Despite this, we were able to demonstrate that prolonged
oral treatment with RD2RD2 significantly increased its therapeutic efficacy in SOD1^{G93A} mice.
Treatment with RD2RD2 improved the phenotype of SOD1^{G93A} mice in comparison to placebo,
led to a reduction of the inflammatory response and decreased neurodegeneration. RD2RD2
is a promising candidate for further development and testing towards a disease modifying
495 treatment in ALS.

References

1. Magnus, T. *et al.* Disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: Predictors of survival. *Muscle Nerve* **25**, 709-714, 10.1002/mus.10090 (2002).
2. McDermott, C. J. & Shaw, P. J. Diagnosis and management of motor neurone disease. *BMJ* **336**, 658-662, (2008).
3. Niedermeyer, S., Murn, M. & Choi, P. J. Respiratory failure in amyotrophic lateral sclerosis. *Chest* **155**, 401-408, <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.06.035> (2019).
4. Renton, A. E., Chiò, A. & Traynor, B. J. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* **17**, 17, (2014).
- 505 5. Taylor, J. P., Brown, R. H. & Cleveland, D. W. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* **539**, 197-206, (2016).
6. Andersen, P. M. *et al.* Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **4**, 62-73, (2003).
- 510 7. Andersen, P. M. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **6**, 37-46, (2006).
8. Rosen, D. R. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62, (1993).
9. Cudkowicz, M. *et al.* Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* **41**, 210-221, (1997).
- 515 10. Corrado, L. *et al.* SOD1 gene mutations in Italian patients with Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Neuromuscul. Disord.* **16**, 800-804, (2006).
11. Kwon, M.-J. *et al.* Screening of the SOD1, FUS, TARDBP, ANG, and OPTN mutations in Korean patients with familial and sporadic ALS. *Neurobiol. Aging* **33**, 1017. e1017-1017. e1023, (2012).
- 520 12. McGoldrick, P., Joyce, P. I., Fisher, E. M. & Greensmith, L. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1832**, 1421-1436, (2013).
- 525 13. Philips, T. & Rothstein, J. D. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **69**, 5.67. 61-65.67. 21, (2015).
14. Picher-Martel, V., Valdmanis, P. N., Gould, P. V., Julien, J.-P. & Dupré, N. From animal models to human disease: a genetic approach for personalized medicine in ALS. *Acta neuropathologica communications* **4**, 70, (2016).
- 530 15. Lutz, C. Mouse models of ALS: Past, present and future. *Brain Res.* **1693**, 1-10, (2018).

16. Gurney, M. E. *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772-1775, (1994).
17. Chiu, A. *et al.* Age-Dependent Penetrance Of Disease In A Transgenic Mouse Model Of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular and cellular neurosciences* **6**, 349, 535 (1995).
18. Alexander, G. M. *et al.* Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Mol. Brain Res.* **130**, 7-15, (2004).
19. Marcuzzo, S. *et al.* Hind limb muscle atrophy precedes cerebral neuronal degeneration in G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: A longitudinal MRI study. *Exp. 540 Neurol.* **231**, 30-37, <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.05.007> (2011).
20. Ferrante, R. J. *et al.* Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **69**, 2064-2074, (1997).
21. Yoshihara, T. *et al.* Differential expression of inflammation-and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral 545 sclerosis. *J. Neurochem.* **80**, 158-167, (2002).
22. Philips, T. & Robberecht, W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol.* **10**, 253-263, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70015-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70015-1) (2011).
23. Beers, D. R. *et al.* Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical 550 responses in ALS mice. *Brain, behavior, and immunity* **25**, 1025-1035, (2011).
24. McCombe, P. A. & Henderson, R. D. The Role Of Immune And Inflammatory Mechanisms In ALS. *Curr. Mol. Med.* **11**, 246-254, (2011).
25. Evans, M. C., Couch, Y., Sibson, N. & Turner, M. R. Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Cell. Neurosci.* **53**, 34-41, 555 <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.10.008> (2013).
26. Hall, E. D., Oostveen, J. A. & Gurney, M. E. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* **23**, 249-256, (1998).
27. Haidet-Phillips, A. M. *et al.* Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic 560 to motor neurons. *Nat. Biotechnol.* **29**, 824, 10.1038/nbt.1957, <https://www.nature.com/articles/nbt.1957#supplementary-information> (2011).
28. Geloso, M. C. *et al.* The dual role of microglia in ALS: mechanisms and therapeutic approaches. *Front. Aging Neurosci.* **9**, 242, (2017).
29. Elliott, J. L. Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral 565 sclerosis. *Mol. Brain Res.* **95**, 172-178, [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00242-X](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00242-X) (2001).

30. Jeyachandran, A., Mertens, B., McKissick, E. A. & Mitchell, C. S. Type I Vs. Type II cytokine levels as a function of SOD1 G93A mouse amyotrophic lateral sclerosis disease progression. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 462, (2015).
- 570 31. Miller, R. G. & Appel, S. H. Introduction to supplement: the current status of treatment for ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* **18**, 1-4, 10.1080/21678421.2017.1361447 (2017).
32. Mathis, S., Couratier, P., Julian, A., Corcia, P. & Le Masson, G. Current view and perspectives in amyotrophic lateral sclerosis. *Neural regeneration research* **12**, 181, (2017).
- 575 33. Gordon, P. H. Amyotrophic lateral sclerosis. *CNS drugs* **25**, 1-15, (2011).
34. Dorst, J., Ludolph, A. C. & Huebers, A. Disease-modifying and symptomatic treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **11**, 1-16, (2017).
35. Leithold, L. H. E. *et al.* Pharmacokinetic properties of tandem d-peptides designed for treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharm. Sci.* **89**, 31-38, 580 <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.04.016> (2016).
36. Schartmann, E. *et al.* In Vitro Potency and Preclinical Pharmacokinetic Comparison of All-D-Enantiomeric Peptides Developed for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* **64**, 859-873, (2018).
37. Elfgen, A. *et al.* Metabolic resistance of the D-peptide RD2 developed for direct 585 elimination of amyloid- β oligomers. *Sci. Rep.* **9**, 5715, 10.1038/s41598-019-41993-6 (2019).
38. Kutzsche, J. *et al.* Safety and pharmacokinetics of the orally available antiprion compound PRI-002: A single and multiple ascending dose phase I study. *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)* **6**, e12001-e12001, 10.1002/trc2.12001 (2020).
39. van Groen, T. *et al.* The A β oligomer eliminating D-enantiomeric peptide RD2 improves 590 cognition without changing plaque pathology. *Sci. Rep.* **7**, 16275, 10.1038/s41598-017-16565-1 (2017).
40. Schemmert, S. *et al.* A β oligomer elimination restores cognition in transgenic Alzheimer's mice with full-blown pathology. *Mol. Neurobiol.* **56**, 2211-2223, (2019).
41. Schemmert, S. *et al.* Deceleration of the neurodegenerative phenotype in 595 pyroglutamate-A β accumulating transgenic mice by oral treatment with the A β oligomer eliminating compound RD2. *Neurobiol. Dis.* **124**, 36-45, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.10.021> (2019).
42. Zhang, T., Loschwitz, J., Strodel, B., Nagel-Steger, L. & Willbold, D. Interference with amyloid- β nucleation by transient ligand interaction. *Molecules* **24**, 2129, (2019).
- 600 43. Kutzsche, J. *et al.* Large-scale oral treatment study with the four most promising D3-derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules* **22**, 1693, (2017).
44. Post, J. *et al.* A Novel Anti-Inflammatory d-Peptide Inhibits Disease Phenotype Progression in an ALS Mouse Model. *Molecules* **26**, 1590, (2021).

45. Ohgomori, T. *et al.* Differential activation of neuronal and glial STAT3 in the spinal cord of the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* **46**, 2001-2014, 10.1111/ejn.13650 (2017).
46. Dunkelmann, T. *et al.* Comprehensive characterization of the pyroglutamate amyloid- β induced motor neurodegenerative phenotype of TBA2. 1 mice. *J. Alzheimer's Dis.* **63**, 115-130, 10.3233/JAD-170775 (2018).
- 610 47. Rogers, D. C. *et al.* Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm. Genome* **8**, 711-713, 10.1007/s003359900551 (1997).
48. Rogers, D. C. *et al.* SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neurosci. Lett.* **306**, 89-92, [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01885-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01885-7) (2001).
- 615 49. Ogawa, N., Hirose, Y., Ohara, S., Ono, T. & Watanabe, Y. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **50**, 435-441, (1985).
50. Abramow-Newerly, W. *et al.* Methods to rapidly and accurately screen a large number of ENU mutagenized mice for abnormal motor phenotypes. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* **7**, 112-118, (2006).
- 620 51. Mead, R. J. *et al.* Optimised and rapid pre-clinical screening in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One* **6**, e23244, (2011).
52. Tadros, M. A. *et al.* Are all spinal segments equal: intrinsic membrane properties of superficial dorsal horn neurons in the developing and mature mouse spinal cord. *J. Physiol.* **590**, 2409-2425, 10.1113/jphysiol.2012.227389 (2012).
- 625 53. Hugnot, J.-P., *Isolate and culture neural stem cells from the mouse adult spinal cord*, in *Neural Progenitor Cells*. 2013, Springer. p. 53-63.
54. Paxinos, G. & Franklin, K. B., *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2019: Academic press.
- 630 55. McQuin, C. *et al.* CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLoS Biol.* **16**, e2005970, 10.1371/journal.pbio.2005970 (2018).
56. Clark, R. A., Shoaib, M., Hewitt, K. N., Stanford, S. C. & Bate, S. T. A comparison of InVivoStat with other statistical software packages for analysis of data generated from animal experiments. *J. Psychopharm.* **26**, 1136-1142, (2012).
- 635 57. Ferrucci, M. *et al.* A systematic study of brainstem motor nuclei in a mouse model of ALS, the effects of lithium. *Neurobiology of disease* **37**, 370-383, (2010).
58. Dibaj, P. *et al.* Influence of methylene blue on microglia-induced inflammation and motor neuron degeneration in the SOD1G93A model for ALS. *PLoS one* **7**, (2012).

- 640 59. Rudnick, N. D. *et al.* Distinct roles for motor neuron autophagy early and late in the SOD1G93A mouse model of ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, E8294-E8303, (2017).
60. Jara, J. H. *et al.* Evidence for an early innate immune response in the motor cortex of ALS. *J. Neuroinflammation* **14**, 129, 10.1186/s12974-017-0896-4 (2017).
- 645 61. Cleveland, D. W. & Rothstein, J. D. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 806-819, (2001).
62. Arthur, K. C. *et al.* Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nature communications* **7**, 1-6, (2016).
63. McCauley, M. E. & Baloh, R. H. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta*
650 *Neuropathol.* **137**, 715-730, (2019).
64. Beers, D. R. & Appel, S. H. Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. *Lancet Neurol.* **18**, 211-220, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30394-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30394-6) (2019).
65. Boillée, S. *et al.* Onset And Progression In Inherited Als Determined By Motor Neurons And Microglia. *Science* **312**, 1389-1392, 10.1126/science.1123511 (2006).
66. Hensley, K. *et al.* Primary glia expressing the G93A-SOD1 mutation present a neuroinflammatory phenotype and provide a cellular system for studies of glial inflammation. *J. Neuroinflammation* **3**, 2, (2006).
67. Hooten, K. G., Beers, D. R., Zhao, W. & Appel, S. H. Protective and toxic
660 neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotherapeutics* **12**, 364-375, 10.1007/s13311-014-0329-3 (2015).
68. Becher, B., Spath, S. & Goverman, J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology* **17**, 49-59, 10.1038/nri.2016.123 (2017).
69. Mammana, S. *et al.* The role of macrophages in neuroinflammatory and
665 neurodegenerative pathways of alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and multiple sclerosis: Pathogenetic cellular effectors and potential therapeutic targets. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 831, (2018).
70. Henkel, J. S., Beers, D. R., Zhao, W. & Appel, S. H. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **4**, 389-398, (2009).
- 670 71. Zhao, W., Beers, D. R. & Appel, S. H. Immune-mediated mechanisms in the pathoprosession of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **8**, 888-899, (2013).
72. Keller, A. F., Gravel, M. & Kriz, J. Treatment with minocycline after disease onset alters astrocyte reactivity and increases microgliosis in SOD1 mutant mice. *Exp. Neurol.* **228**, 69-79,
675 (2011).

73. Patel, P., Julien, J.-P. & Kriz, J. Early-stage treatment with Withaferin A reduces levels of misfolded superoxide dismutase 1 and extends lifespan in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotherapeutics* **12**, 217-233, (2015).
74. Apolloni, S., Fabbrizio, P., Amadio, S. & Volonté, C. Actions of the antihistaminergic clemastine on presymptomatic SOD1-G93A mice ameliorate ALS disease progression. *J. Neuroinflammation* **13**, 1-15, (2016).
75. Lewis, K. E. *et al.* Microglia and motor neurons during disease progression in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: changes in arginase1 and inducible nitric oxide synthase. *J. Neuroinflammation* **11**, 55, 10.1186/1742-2094-11-55 (2014).
76. Beers, D. R. *et al.* Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain : a journal of neurology* **134**, 1293-1314, 10.1093/brain/awr074 (2011).
77. Prado, L. d. G. R. *et al.* Longitudinal assessment of clinical and inflammatory markers in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **394**, 69-74, <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.08.033> (2018).
78. Jankowsky, J. L. *et al.* Rodent A β modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **282**, 22707-22720, (2007).
79. Liu, Z. *et al.* Peripheral and Central Nervous System Immune Response Crosstalk in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Neurosci.* **14**, 10.3389/fnins.2020.00575 (2020).

695

Figure legend

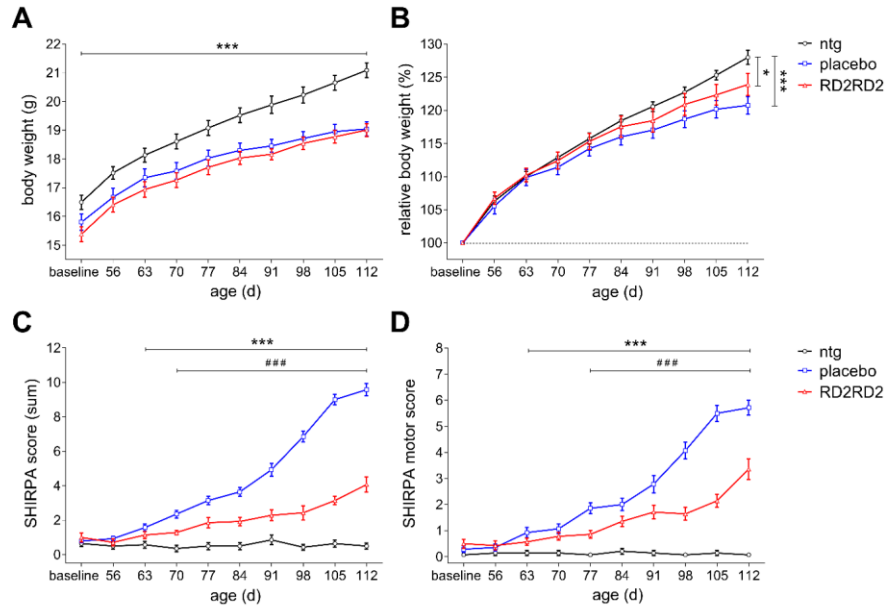
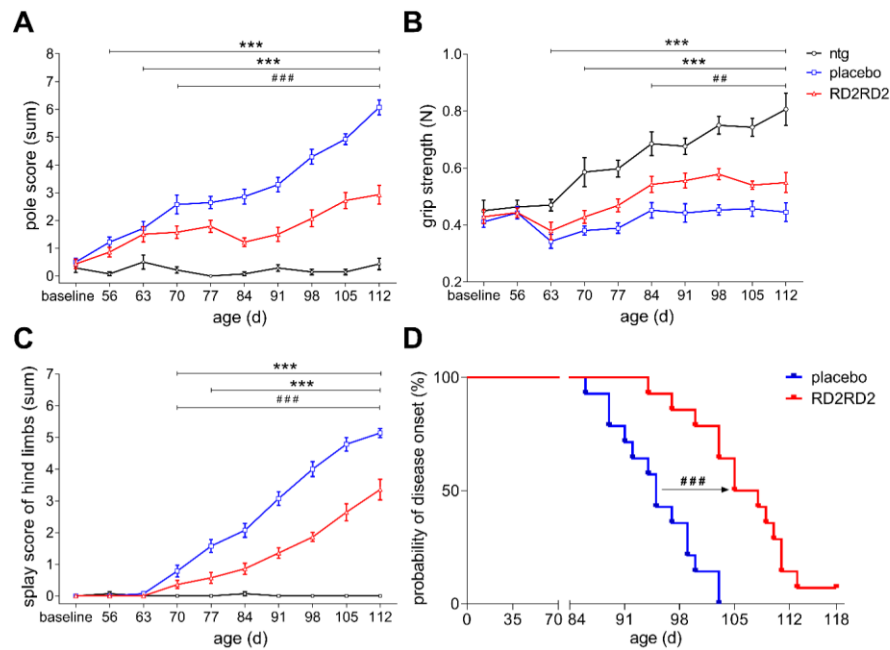


Figure 1: Development of body weight and phenotype in the p.o. treatment study.

Changes in body weight over time during treatment was analysed of transgenic and non-transgenic mice (A and B). Phenotype assessment was performed using the SHIRPA test battery (C). Subdivision of the SHIRPA parameters into a motor score revealed additional information of motor symptom progression in RD2RD2- vs placebo-treated SOD1^{G93A} (D). Data is represented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were conducted by two-way RM ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis, n = 14 each group (A to D). Results of analysis: (A) absolute body weight (g), $F(2,351) = 10.76$, $p < 0.001$, Fisher LSD post hoc analysis, ntg vs placebo $p < 0.001$, ntg vs RD2RD2 $p < 0.001$; (B) relative body weight (%), $F(18,351) = 3.84$, $p < 0.001$, Fisher LSD post hoc analysis, ntg vs placebo $p < 0.001$, ntg vs RD2RD2 $p = 0.013$; (C) SHIRPA test, $F(2,351) = 255.58$, $p < 0.001$, Fisher LSD post hoc analysis, ntg vs placebo $p < 0.001$, ntg vs RD2RD2 $p < 0.001$ and $F(1,234) = 146.26$, $p < 0.001$, Fisher LSD post hoc analysis, placebo vs RD2RD2 $p < 0.001$ and (D) SHIRPA motor test, $F(1,234) = 53.39$, $p < 0.001$, Fisher's LSD post hoc analysis, placebo vs RD2RD2 $p < 0.001$. Asterisks (*) indicate significance between non-transgenic and placebo group (ntg vs placebo or ntg vs RD2RD2: * $p = 0.05$ and *** $p < 0.001$). Lozenges (#) indicate significance between transgenic treatment groups (placebo vs RD2RD2: ### $p < 0.001$).



715

Figure 2: RD2RD2 administration prevented deficits in motor performance and delayed onset of disease in *SOD1^{G93A}* mice. Motor skills from RD2RD2-treated mice vs placebo treatment were analysed using different motor tests, i.e. the pole test (A). In grip strength and splay reflex test of hind limbs (B and C) retardation of the motor impairments were measured. Disease onset was assessed using the score of *Mead et al. (2011)* [51] (D). Data is represented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were conducted by two-way RM ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis, $n = 14$ each group (A to C) or by Kaplan-Meier survival analysis with log-rank analysis (D), placebo = 14 and RD2RD2 $n = 13$. Results of analysis: (A) pole test, $F(2,351) = 287.81$, $p < 0.001$, ntg vs placebo $p < 0.002$, ntg vs RD2RD2 $p < 0.012$ and $F(1,234) = 99.20$, $p < 0.001$, Fisher LSD post hoc analysis, placebo vs RD2RD2 $p < 0.001$; (B) grip strength test, $F(2,351) = 54.13$, $p < 0.001$, ntg vs placebo $p < 0.022$, ntg vs RD2RD2 $p < 0.002$ and $F(1,234) = 29.31$, $p < 0.001$, Fisher LSD post hoc analysis, placebo vs RD2RD2 $p < 0.001$ and (C) splay reflex test of hind limbs, $F(2,351) = 250.93$, $p < 0.001$, ntg vs placebo $p < 0.001$, ntg vs RD2RD2 $p < 0.047$ and $F(1,234) = 79.78$, $p < 0.001$, Fisher LSD post hoc analysis, placebo vs RD2RD2 $p < 0.001$ and (D) probability of disease onset (%), log-rank test = 18.31, $DF = 1$, placebo vs RD2RD2 $p < 0.001$. Asterisks (*) indicate significance between non-transgenic and transgenic treatment groups (ntg vs placebo or ntg vs RD2RD2: *** $p < 0.001$). Lozenges (##) indicate significance between transgenic treatment groups (placebo vs RD2RD2: ## $p = 0.01$ and ### $p < 0.001$).

720

725

730

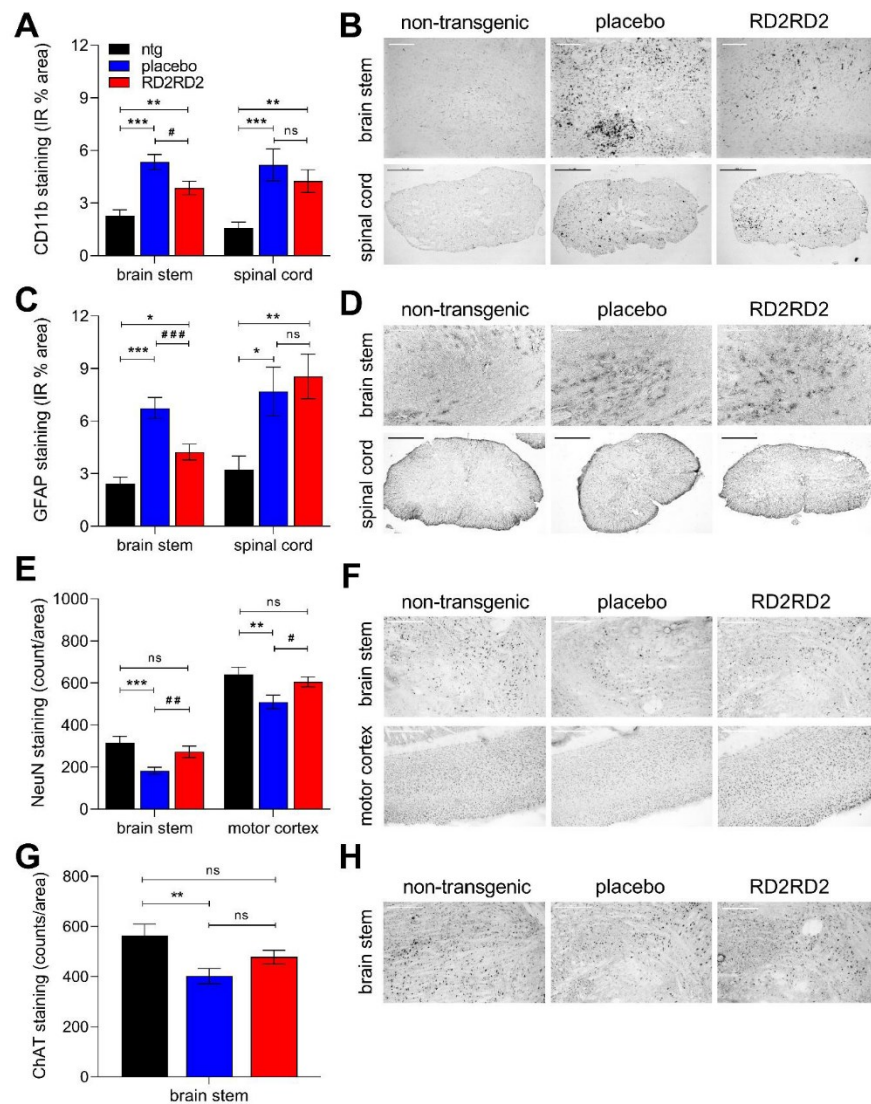


Figure 3: Amelioration of neurodegeneration and neuroinflammation in brain and lumbar spinal cord of SOD1^{G93A} mice by *per oral* treatment with RD2RD2. Investigations of a potential reduction in either gliosis (A to D) or neuron loss (E to H) after RD2RD2 treatment were performed using immunohistochemical analysis. Gliosis was analysed by microglia (A and B) and astrocytes (C and D) staining in the brain stem and lumbar spinal cord. Preservation of neurons was quantified after mature neuron (E and F) and motor neuron (G and H) staining in different areas of the brain (brain stem and motor cortex). Data is represented as mean ±

SEM. Statistical calculations were conducted by one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis (A, C, E and G). Asterisks (*) indicate significance between non-transgenic and transgenic treatment groups (ntg vs placebo or ntg vs RD2RD2: * $p = 0.05$, ** $p = 0.001$ and *** $p < 0.001$). Lozenges (#) indicate significance between transgenic treatment groups (placebo vs RD2RD2: # $p = 0.05$, ## $p = 0.01$ and ### $p < 0.001$). p values of > 0.05 was considered to be statistically not significant (ns). IR: immunoreactivity

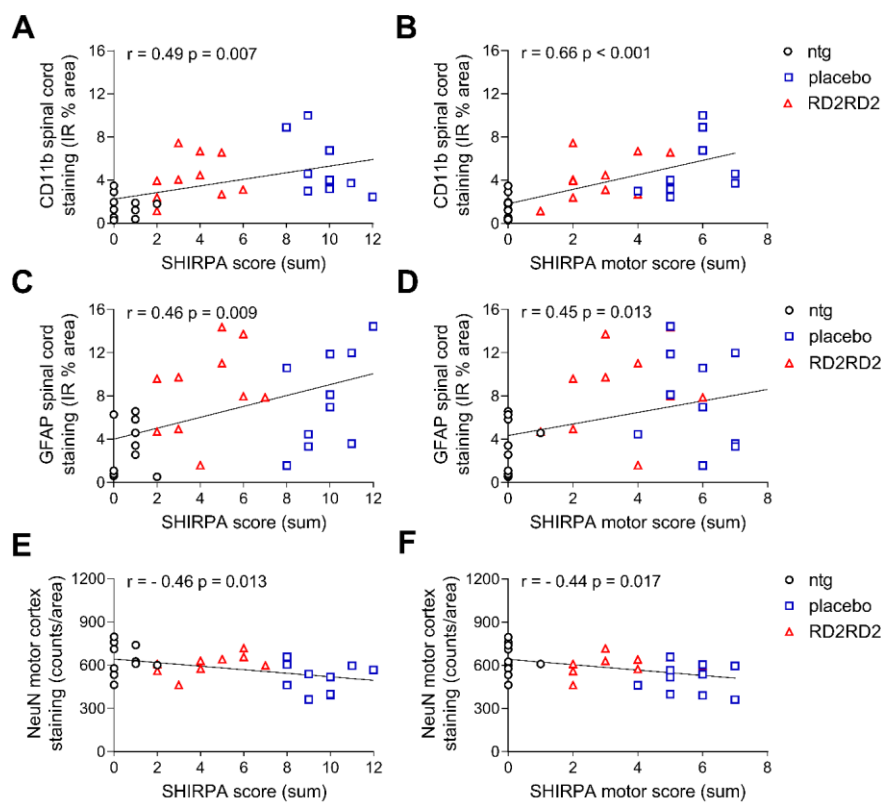


Figure 4: Correlation between histological quantifications and SHIRPA scores over all three groups. Significant correlation was observed between quantified microglia (A and B) and astrocytes (C and D) in the spinal cord and the SHIRPA scores of mice. Calculation of the correlation coefficient was performed between quantified mature neurons (E and F) in the motor cortex and the SHIRPA scores over all three groups. Data were analysed using Pearson correlation coefficient (r). IR: immunoreactivity

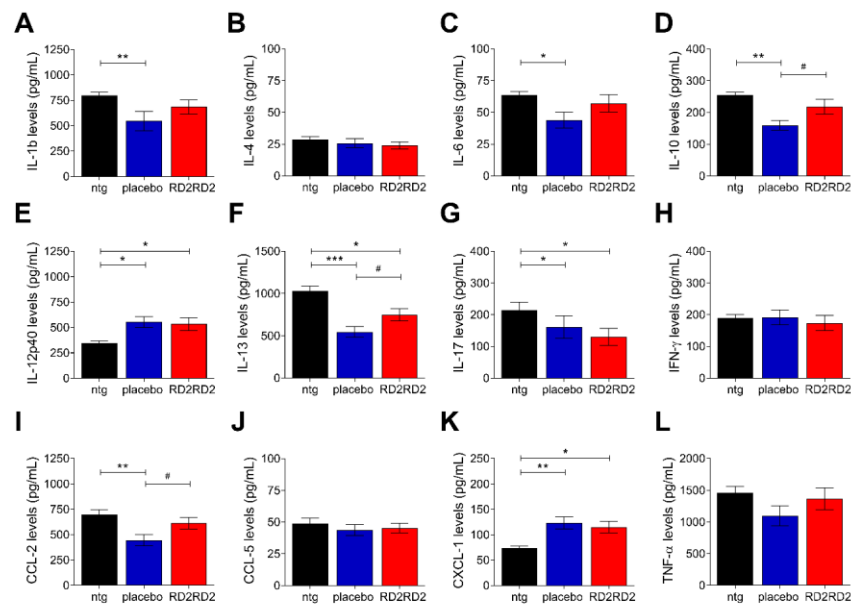


Figure 5: Treatment with RD2RD2 led to differences in several cytokine levels vs non-transgenic and placebo-treated SOD1^{G93A} mice. A multiplex immunoassay was used to analyse a possible change of inflammatory cytokines at the end of the study. Cytokine concentrations are given in picogram per milliliter (pg/mL). Data is represented as mean ± SEM. Statistical calculations were conducted by one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis (A to L), ntg n = 7, placebo n = 11 and RD2RD2 n = 11. Asterisks (*) indicate significance between non-transgenic and transgenic treatment groups (ntg vs placebo and ntg vs RD2RD2: * p = 0.05, ** p = 0.01 and *** p < 0.001). Lozenges (#) indicate significance between transgenic treatment groups (placebo vs RD2RD2: # p = 0.05).

Acknowledgements

D.W. was supported by grants from the Russian Science Foundation (RSF) (project no. 20-64-46027) and by the Technology Transfer Fund of the Forschungszentrum Jülich. K.-J.L. and D.W. were supported by "Portfolio Drug Research" of the "Impuls und Vernetzungs-Fonds der Helmholtzgemeinschaft".

Author Contributions

J.P., A.W., J.K. and D.W. planned and designed the study. All *in vivo* experiments were performed by J.P.. Immunohistochemical experiments were performed by J.P. and A.S.. Reversed-phase high-performance liquid chromatography was conducted by I.G.. Cytokine assay was conducted by S.H. and S.L.. Evaluation and statistical analysis was performed by J.P. and A.W.. The initial manuscript was written by J.P., J.K., A.W. and D.W. with scientific advice of N.J.S. and K.-J.L.. All authors reviewed and contributed to the manuscript.

Competing interests

D.W. is co-inventor of patents covering the composition of matter of RD2RD2. D.W. and A.W. are co-founders and shareholders of the company "Priavoid GmbH", which is planning to further develop RD2RD2. All other authors declare no competing interests.

Availability of data and material

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Supplement

Methods

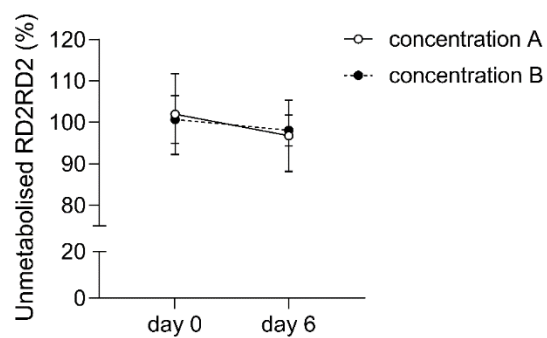
790 Stability measurement of RD2RD2

RD2RD2 were formulated in tailor-made jellies as described in the method section of the manuscript. The concentration of RD2RD2 was analysed in freshly formulated (day 0) and 6 days-old jellies. Two different concentrations of RD2RD2 were measured which depends on the dosage of 50 mg/kg and thus on the average weight of the mice (concentration A: 1257 μ M (treatment start, average weight of transgenic mice 16.0 g) and concentration B: 1414 μ M (14 week-aged mice, average weight of transgenic mice 18.0 g)).

High-performance liquid chromatography

A metabolite profile of RD2RD2 incubated in jellies was recorded by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). To measure the concentration of RD2RD2, 800 200 μ L of 20 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA) (Roth, Karlsruhe, Germany) were added to the samples and vortexed for at least 1 min at room temperature. The samples were centrifuged at 14.000 x g for 10 min at 4 °C and the supernatant containing the derivatives was transferred to new pre-chill tubes and used for the assessment of RD2RD2. Afterward, samples were analysed by RP-HPLC using the Agilent 1260 Infinity II system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Chromatography was performed with a C18 column (Agilent Technologies, Zorbax 300SB-C18 5 μ m, 4.6 mm x 250 mm; Santa Clara, USA) at 25 °C with a flow rate of 1 mL/min. Ultraviolet absorbance was recorded at 214 nm. The sample injection volume was 20 μ L. Chromatograms were recorded and analysed by Agilent OpenLAB CDS (software version 2.5, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). For sample analysis from stability tests, mobile 810 phases consisted of water (A) and acetonitrile (B) each supplemented with 0.1 % (v/v) TCA (AppliChem, Darmstadt, Germany). The samples were measured isocratically at 10 % solvent B for 10 min. Afterward, a gradient was applied from 10 % to 45 % of the acetonitrile solvent in a measurement of 20 min. The samples were measured in triplicate and normalised peak areas of each measurement were averaged. GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., USA) was 815 used for the graphic illustrations. Data are presented as mean $\pm$ SEM.

Figures



820 **Figure S1: Stability of RD2RD2 in tailor-made jellies.** RD2RD2 was incubated in freshly formulated (day 0) and 6 days-old jellies in two different concentrations (A and B). RP-HPLC measurements revealed a minimum loss of RD2RD2 after 6 days of incubation (A: 3.24 ± 8.57 % and B: 1.95 ± 3.69 %), however RD2RD2 remained stable. Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 3 of each concentration).

825 Tables

Table S1: Analysis of ALS pathology in brain and lumbar spinal cord sections of RD2RD2-treated SOD1^{G93A} mice and non-transgenic littermates. Data indicate a significant change in neurodegeneration (staining with NeuN and ChAT antibodies) and neuroinflammation (staining with antibodies against CD11b and GFAP) upon 63 days of *per*
830 *ora*/treatment with RD2RD2. Data is represented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were conducted by one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis. Asterisks (*) indicate significance between non-transgenic and transgenic treatment groups (ntg vs placebo or ntg vs RD2RD2: * $p = 0.05$, ** $p = 0.001$ and *** $p < 0.001$). Lozenges (#) indicate significance between transgenic treatment groups (placebo vs RD2RD2: # $p = 0.05$, ## $p = 0.01$ and ### $p < 0.001$). p values of > 0.05 was considered to be statistically not significant (ns). IR: immunoreactivity

IR (%)	area	ntg	placebo	RD2RD2	statistic
CD11b	brain stem	2.28 $\pm$ 0.34	5.34 $\pm$ 0.43 ***	3.86 $\pm$ 0.39 **, #	F(2,39) = 15.6, $p < 0.001$ ntg vs placebo $p < 0.001$ ntg vs RD2RD2 $p = 0.006$ placebo vs RD2RD2 $p = 0.010$
	lumbar spinal cord	1.58 $\pm$ 0.34	5.18 $\pm$ 0.91 ***	4.26 $\pm$ 0.65 **	F(2,26) = 8.14, $p = 0.002$ ntg vs placebo $p < 0.001$ ntg vs RD2RD2 $p = 0.007$ placebo vs RD2RD2 ns
GFAP	brain stem	2.42 $\pm$ 0.39	6.75 $\pm$ 0.59 ***	4.24 $\pm$ 0.46 *, ###	F(2,36) = 19.1, $p < 0.001$ ntg vs placebo $p < 0.001$ ntg vs RD2RD2 $p = 0.016$ placebo vs RD2RD2 $p < 0.001$
	lumbar spinal cord	3.23 $\pm$ 0.78	7.69 $\pm$ 1.39 *	8.55 $\pm$ 1.28 **	F(2,27) = 5.88, $p = 0.008$ ntg vs placebo $p = 0.012$ ntg vs RD2RD2 $p = 0.004$ placebo vs RD2RD2 ns
counts	area	ntg	placebo	RD2RD2	statistic
NeuN	brain stem	316 $\pm$ 29.9	182 $\pm$ 16.4 ***	273 $\pm$ 27.1 ##	F(2,35) = 7.68, $p = 0.002$ ntg vs placebo $p < 0.001$ ntg vs RD2RD2 ns placebo vs RD2RD2 $p = 0.009$
	motor cortex	641 $\pm$ 33.8	509 $\pm$ 32.1 **	605 $\pm$ 23.6 #	F(2,26) = 5.08, $p = 0.014$ ntg vs placebo $p = 0.005$ ntg vs RD2RD2 ns placebo vs RD2RD2 $p = 0.038$
ChAT	brain stem	564 $\pm$ 45.2	402 $\pm$ 30.1 **	477 $\pm$ 27.3	F(2,30) = 5.32, $p = 0.010$ ntg vs placebo $p = 0.003$ ntg vs RD2RD2 ns placebo vs RD2RD2 ns

840 **Table S2: Pearson's correlation coefficient between SHIRPA scores and cell quantifications.** Asterisks (*) indicate significance between all three treatment groups (overall effect: ntg vs placebo vs RD2RD2: * p = 0.05, ** p = 0.01 and *** p < 0.001). r = Pearson correlation coefficient, IR: immunoreactivity

SHIRPA score vs						
area	CD11b (IR %)	GFAP (IR %)	area	NeuN (counts)	area	ChAT (counts)
brain stem	r = 0.32 *	r = 0.67 ***	brain stem	r = - 0.51 ***	brain stem	r = - 0.46 **
lumbar spinal cord	r = 0.49 **	r = 0.46 **	motor cortex	r = - 0.47 *		
SHIRPA motor score vs						
area	CD11b (IR %)	GFAP (IR %)	area	NeuN (counts)	area	ChAT (counts)
brain stem	r = 0.72 ***	r = 0.65 ***	brain stem	r = - 0.52 ***	brain stem	r = - 0.51 **
lumbar spinal cord	r = 0.66 ***	r = 0.45 *	motor cortex	r = - 0.44 *		

Table S3: Analysis of plasma revealed differences in several cytokine levels of SOD1^{G93A} mice vs non-transgenic littermates and between RD2RD2 and placebo-treated mice.

845 Cytokine levels were determined using a multiplex immunoassay. Cytokine concentrations are given in picogram per milliliter (pg/mL). Data is represented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were conducted by one-way ANOVA with Fisher's LSD post hoc analysis, ntg n = 7, placebo n = 11 and RD2RD2 n = 11. Asterisks (*) indicate significance between non-transgenic and transgenic treatment groups (ntg vs placebo and ntg vs RD2RD2: * p = 0.05, 850 ** p = 0.01 and *** p < 0.001). Lozenges (#) indicate significance between transgenic treatment groups (placebo vs RD2RD2: # p = 0.05).

concentration (pg/mL)	ntg	placebo	RD2RD2	statistic
IL-1 β	797 $\pm$ 33.1	545 $\pm$ 97.0 *	685 $\pm$ 70.2	F(2,22) = 2.61, p = 0.096 ntg vs placebo p = 0.033 ntg vs RD2RD2 ns placebo vs RD2RD2 ns
IL-4	28.3 $\pm$ 2.45	25.6 $\pm$ 3.46	23.8 $\pm$ 2.81	F(2,18) = 0.68, p = 0.516 ntg vs placebo ns ntg vs RD2RD2 ns placebo vs RD2RD2 ns
IL-6	63.6 $\pm$ 2.94	43.9 $\pm$ 6.29 *	57.1 $\pm$ 6.99	F(2,21) = 2.62, p = 0.096 ntg vs placebo p = 0.037 ntg vs RD2RD2 ns placebo vs RD2RD2 ns
IL-10	254 $\pm$ 9.55	159 $\pm$ 15.4 **	217 $\pm$ 23.6 #	F(2,21) = 6.33, p < 0.007 ntg vs placebo p = 0.002 ntg vs RD2RD2 ns placebo vs RD2RD2 p = 0.033
IL-12p40	344 $\pm$ 22.6	554 $\pm$ 51.4 *	533 $\pm$ 63.5 *	F(2,26) = 3.64, p = 0.040 ntg vs placebo p = 0.017 ntg vs RD2RD2 p = 0.031 placebo vs RD2RD2 ns
IL-13	1028 $\pm$ 59.0	546 $\pm$ 64.1 ***	748 $\pm$ 73.2 *, #	F(2,24) = 11.48, p < 0.001 ntg vs placebo p < 0.001 ntg vs RD2RD2 p = 0.011 placebo vs RD2RD2 p = 0.036
IL-17	214 $\pm$ 25.1	129 $\pm$ 20.1 *	130 $\pm$ 26.8 *	F(2,23) = 4.66, p = 0.020 ntg vs placebo p = 0.007 ntg vs RD2RD2 p = 0.027 placebo vs RD2RD2 ns
INF- γ	189 $\pm$ 10.4	190 $\pm$ 23.5	173 $\pm$ 23.7	F(2,21) = 0.21, p = 0.816 ntg vs placebo ns ntg vs RD2RD2 ns placebo vs RD2RD2 ns
TNF- α	1456 $\pm$ 105	1095 $\pm$ 155	1363 $\pm$ 174	F(2,22) = 1.45, p = 0.255 ntg vs placebo ns ntg vs RD2RD2 ns placebo vs RD2RD2 ns
CCL-2	699 $\pm$ 48.4	444 $\pm$ 55.8 **	612 $\pm$ 55.4 #	F(2,23) = 5.25, p = 0.013 ntg vs placebo p = 0.005 ntg vs RD2RD2 ns placebo vs RD2RD2 p = 0.034
CCL-5	48.6 $\pm$ 4.47	43.6 $\pm$ 4.36	45.3 $\pm$ 3.94	F(2,24) = 0.30, p = 0.740 ntg vs placebo ns ntg vs RD2RD2 ns placebo vs RD2RD2 ns
CXCL-1	73.2 $\pm$ 4.37	123 $\pm$ 11.7 **	114 $\pm$ 11.4 *	F(2,23) = 5.63, p = 0.010 ntg vs placebo p = 0.004 ntg vs RD2RD2 p = 0.013 placebo vs RD2RD2 ns

4 Weitere Ergebnisse

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Stellungnahme

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde in einer ersten Pilotstudie das ALS-spezifische Mausmodell SOD1*G93A in unserem Labor charakterisiert und verschiedenste Verhaltenstests etabliert, um den Phänotyp mit aus der Literatur beschriebenen Daten abzugleichen. Das Mausmodell gehört zu den Standards in der präklinischen ALS Forschung und ist bereits intensiv charakterisiert, weshalb die Daten der Charakterisierungsstudie nur zum Teil in die Publikation „*A novel anti-inflammatory D-peptide inhibits disease phenotype progression in an ALS mouse model*“ (Kapitel 3.1) integriert wurden und deshalb nachfolgend alle erhobenen Daten zusammengefasst sind. Als Kontrollgruppe wurden nicht-transgene (ntg) Geschwistertiere untersucht. Nach der Etablierung des SOD1*G93A Mausmodells in unserer Forschungseinrichtung und spezifischer Anpassungen der Verhaltenstests, sowie der Versuchszeiträume wurden drei verschiedene Therapiestudien durchgeführt. Aufgrund einer Fehllieferung des Peptidherstellers wurde den Mäusen in der dritten Therapiestudie (Überlebensstudie) die L-Form des Peptids appliziert, anstelle der D-Form wie in den vorherigen Studien. Nachfolgend werden die zwei Peptide unterschieden durch die folgenden Bezeichnungen: 1.) RD2RD2, d.h. die D-enantiomere Form des Peptids wurde verwendet und 2.) L-RD2RD2, d.h. die L-enantiomere Form des Peptids wurde verwendet. Die Daten der ersten beiden Therapiestudien wurden zur Publikation eingereicht, während die Ergebnisse der dritten Therapiestudie nachfolgend zusammengefasst sind. Alle Versuche wurden nach dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG §§ 7-9) und mit Genehmigung der örtlichen Behörde (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV), Nordrhein-Westfalen, Deutschland; Aktenzeichen AZ 84-02.04.2015.A106 und AZ 84-02.04.2014.A423) durchgeführt.

4.1.2 Studienplan und Verhaltensanalysen

In allen durchgeführten Studien dieser Arbeit wurden weibliche Mäuse verwendet. Für das SOD1*G93A Mausmodell ist bekannt, dass transgene SOD1*G93A Weibchen weniger Nachwuchs in Verpaarungen mit nicht-transgenen (Wildtyp) Männchen erzeugen im Gegensatz verpaarter transgener SOD1*G93A Männchen mit nicht-transgenen (Wildtyp) Weibchen (Leitner et al., 2009), weshalb die transgenen Böcke für die Zucht eingesetzt wurden. Für den Zuchtbeginn wurden transgene SOD1*G93A Männchen von der Firma

The Jackson Laboratory (JAX; B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J, #004435, Bar Harbor, USA) und C57BL/6J Weibchen von der Firma *Charles River Laboratories* (C57BL/6J (JAX Mausstamm), Nummer 632, Sulzfeld, Deutschland) geordert. Der SOD1*G93A spezifische Phänotyp wurde in einer ersten Studie in verschiedenen Verhaltensanalysen charakterisiert (Abb. 2 a). In einem zweiwöchigen Intervall wurden transgene SOD1*G93A Mäuse (tg n = 14) und nicht-transgene Geschwistertiere (ntg n = 14) in verschiedenen Verhaltenstests untersucht. Die Mäuse waren zu Beginn der Charakterisierungsstudie vier Wochen alt und der Versuchszeitraum betrug 16 Wochen. Im Alter von 10 und 20 Wochen wurde bei der Hälfte der Tiere eine Magnetresonanztomographie (MRT) des Zwillingswadenmuskels (latein. *Musculus (M.) gastrocnemius*) durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere per zervikalen Dislokation getötet und für die Organentnahme vorbereitet. Durch die Organentnahme reduzierten sich die Versuchsgruppen der SOD1*G93A Mäuse und nicht-transgenen Geschwistertiere auf je n = 7 für den weiteren Versuchszeitraum. Bei Versuchsende waren alle Mäuse 20 Wochen alt.

Nach zwei erfolgreichen präventiven Studien (Kapitel 3) wurde eine dritte (kurative) Therapiestudie durchgeführt. Im Gegensatz zu den ersten beiden Studien wurden die Tiere ab einem Zeitpunkt behandelt, an dem sich die ersten klinischen Defizite in den motorischen Tests einstellten (Abb. 2 b). Es wurde die kurative Wirkung von RD2RD2 untersucht, d.h. es wurde die Frage gestellt, ob die Behandlung nach Ausbruch der Symptomatik ebenso erfolgreich ist wie die Behandlung mit RD2RD2 vor Ausbruch der Symptomatik (präventiv). Der Beginn des Behandlungszeitraum wurde auf der Grundlage der ermittelten Daten der unbehandelten SOD1*G93A Mäuse (Placebo) der vorherigen drei Studien definiert. Daher betrug das Durchschnittsalter bei Behandlungsbeginn 10 Wochen $\pm$ 4 Tage. In der kurativen Therapiestudie wurden SOD1*G93A Mäuse täglich oral (p.o.) mit 50 mg/kg L-RD2RD2 oder Placebo (Trinkwasser) behandelt, die in speziell angefertigten Gelatinedrops formuliert wurden (Schemmert et al., 2019b). Die RD2RD2-Menge in den Gelatinedrops wurde auf der Grundlage der wöchentlich ermittelten durchschnittlichen Körpergewichte der Mäuse berechnet und angepasst. Die kurative p.o. Therapiestudie wurde in vier experimentelle Gruppen unterteilt, bestehend aus je zwei Versuchsgruppen an transgenen SOD1*G93A Mäusen (RD2RD2 n = 14 und Placebo n = 14) und zwei Versuchsgruppen nicht-transgener Geschwistertiere, die oral mit einer gleichen Dosis L-RD2RD2 wie die transgenen SOD1*G93A Geschwistertiere behandelt wurden, um Nebenwirkungen des Peptids auf gesunde Mäuse auszuschließen (Kontrollgruppen: ntg RD2RD2 n = 8 und ntg n = 8). Eine Woche vor Behandlungsbeginn wurden alle Tiere in den unten aufgeführten Verhaltenstests untersucht.

Die Behandlung der transgenen SOD1*G93A Mäuse in der kurativen Therapiestudie wurde bis zum Erreichen definierter Abbruchkriterien durchgeführt (abnormale Körperhaltung, absolute Abwesenheit des Spreizreflexes und schwere Lähmung der Hintergliedmaßen, mehr als 10 % Gewichtsverlust über 48 h oder Verlust des Aufrichtreflexes innerhalb von 10 s), analog dem durch das LANUV genehmigten Beurteilungsbogen (Scoresheet). Eine Woche nachdem das letzte transgene Tier die Abbruchkriterien erreicht hatte, wurde die Behandlung der nicht-transgenen Gruppe beendet.

Zur Charakterisierung des SOD1*G93A spezifischen Phänotyps bzw. des Behandlungseffekts wurden verschiedene Verhaltensanalysen in regelmäßigen Abständen durchgeführt (Offenfeldtest, SHIRPA (engl. *SmithKline, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment*)-Test, modifizierter Stabtest, Greifstärketest und Spreizreflextest der Hinterbeine, Rotarod-Test) (Rogers et al., 1997, Rogers et al., 2001). Die erste Studie umfasste mit der modifizierten Ganganalyse einen zusätzlichen Verhaltenstest. In beiden Studien wurde jeder Verhaltenstest zu Beginn durchgeführt (Basismessungen). Die stratifizierte Randomisierung der transgenen Mäuse in zwei gleichstarke Gruppen wurde auf Grundlage der folgenden Kriterien durchgeführt: ΔC_t (ΔC_t ; engl. *threshold cycle*)-Wert aus der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR; engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction*) (Kapitel 4.1.4) (Ohgomori et al., 2017) und den ermittelten Ergebnissen des SHIRPA- und Stabtests vor Behandlungsbeginn.

Alle Tests wurden zur gleichen Tageszeit durchgeführt, und vor jedem Test wurden alle Mäuse 30 min in Einzelkäfigen habituiert. Die Verhaltensanalysen (Offenfeldtest und SHIRPA-Test) sowie die modifizierte Ganganalyse wurden je Versuchstag einmal durchgeführt, während die motorischen Tests (modifizierter Stabtest, Greifstärketest, Spreiztest der Hinterbeine und Rotarod) je Versuchstag dreimal durchgeführt wurden, sofern nicht anders beschrieben. Die Mäuse wurden täglich auf das Fortschreiten der Krankheit beobachtet. Am Ende der Studien wurden Gewebeproben von allen Tieren genommen. Nach Erreichen der Abbruchkriterien in der kurativen Therapiestudie wurde eine Herzpunktion zur Gewinnung von Blutproben durchgeführt.

Offenfeldtest

Der Offenfeldtest (OFT) ist ein standardisierter Verhaltenstest zur Untersuchung des natürlichen Erkundungsverhaltens von Mäusen (Gould et al., 2009, Hayworth and Gonzalez-Lima, 2009). In ihrer nativen Umgebung meiden Mäuse zum Schutz vor Fressfeinden offene Flächen ohne Rückzugsmöglichkeiten. Wird eine gesunde Maus in die Test-Arena gesetzt, treibt der natürliche Instinkt des Tieres es einerseits an die Umgebung zu erkunden, während andererseits die Angst vor dem Unbekannten und möglicher Gefahren besteht. Zeitgleich zur Analyse des angstassoziierten Verhaltens, können weitere Parameter, wie z.B. die zurückgelegte Distanz, die lokomotorische Aktivität untersucht werden. Gesunde Tiere verbringen eine gewisse Zeitspanne im Zentrum der Test-Arena und laufen zwischen den beiden Bereichen hin und her im Gegensatz zu motorisch beeinträchtigten Tieren. Für die Durchführung des OFT wurde die Test-Arena (44 cm x 44 cm x 30 cm) imaginär in zwei gleiche Bereiche unterteilt: Rand- und Zentrumsbereich (Abb. 3).



Abb. 3 Der Offenfeld und die schematische Darstellung der analysierten Bereiche in der Test-Arena.

Über dem Offenfeldtest befindet sich eine Kamera, die die Aktivität und das Laufverhalten der Mäuse aufzeichnet und an einen mit der Kamera verbundenen Computer übermittelt. Zeitgleich können bis zu vier Tiere im Offenfeld getestet werden. Die Messzeit betrug 30 min. Quelle: J. Post-Schulz

Die Mäuse durften die Arena 30 Minuten lang erkunden. Die Bewegungen der Mäuse wurden mit einer über der Test-Arena angebrachten Videokamera aufgezeichnet und mit der Software Ethovision XT11 (Noldus, Niederlande) aufgenommen. Analysiert wurde die Distanz (cm), die die Tiere während des Experiments zurücklegten, die Laufgeschwindigkeit (cm/s) und die explorative Zeit (s), die sich die Tiere in beiden Bereichen aufhielten. Nach Ablauf der Testzeit beendete die Software automatisch die Aufnahme und die Mäuse

wurden zurück in den Käfig gesetzt. Die Test-Arena wurde nach jedem Durchlauf sorgfältig gesäubert, bevor die nächsten Tiere getestet wurden.

Körpergewicht und SHIRPA-Test

Das Gewicht der Tiere wurde mindestens dreimal pro Woche ab dem Alter von vier Wochen (Beginn der Charakterisierungsstudie) bzw. ab Woche neun (Therapiestudie) aufgezeichnet. Das Wiegen wurde immer zwischen 7 und 8 Uhr morgens durchgeführt, um tageszeitliche Schwankungen zu vermeiden. Zur primären Bewertung des Phänotyps der Tiere wurde der SHIRPA (engl. *SmithKline, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment*)-Test verwendet (Rogers et al., 1997, Rogers et al., 2001). Die Mäuse wurden einzeln in einer Arena von 42,5 cm x 18,0 cm x 26,5 cm (L x H x B) getestet und begutachtet (Abb. 4).

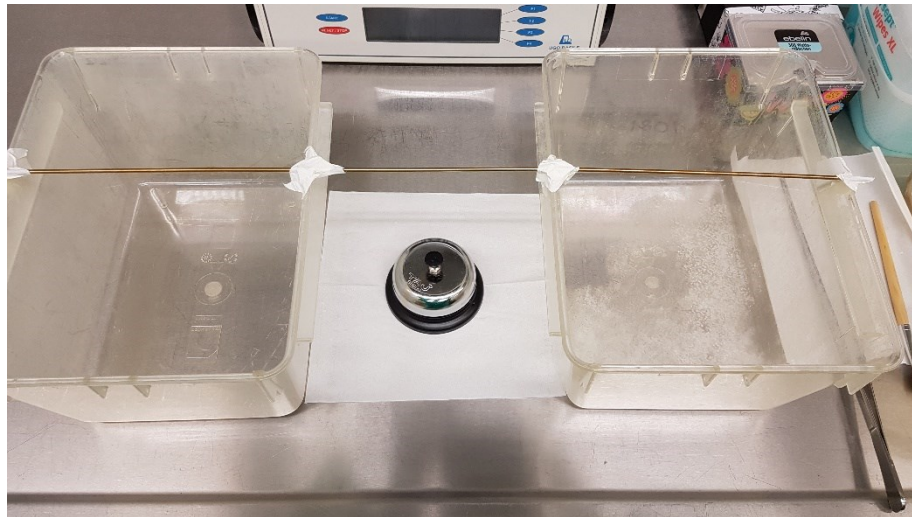


Abb. 4 SHIRPA-Test.

Im SHIRPA-Test wird primär das Verhalten, die Motorik und die Reflexe der Mäuse in verschiedenen Untertests evaluiert. Zeitgleich können zwei Tiere getestet werden. Dafür wurden die Mäuse einzeln in je eine Arena gesetzt und begutachtet. Nach jedem Versuchsdurchlauf wurden die Arenen gesäubert. Quelle: J. Post-Schulz

Der SHIRPA-Test besteht aus einer Batterie von Untertests, die vom Experimentator bewertet und zu einem individuellen SHIRPA-Score zusammengefasst wurden (1. Verhaltensparameter: Unruhe, Wachsamkeit, Schreckreaktion, Berührungsreaktion der Ohren, Lidschlussreflex, Schmerzreflex, Pflege und Apathie und 2. motorische Parameter: Körperhaltung, Gangart, Stellreflex, Greif- und Streckreflex, Fähigkeit eines Klimmzuges, Tremor der Hintergliedmaßen). Alle Untertests wurden zusammen und zusätzlich separat nach den Parametern Verhalten und Motorik analysiert. In den letzten sieben erwähnten Untertests wurden die motorischen Fähigkeiten der Mäuse untersucht, während die davor genannten Untertests sich auf den Parameter Verhalten der Tiere bezogen. Jedes Tier

wurde pro Untertest mit 0 bis 3 Punkten bewertet. Die Punktzahl wurde von 0 (ähnlich wie ntg Geschwistertiere) bis 3 (extrem abnormal im Vergleich zu ntg Geschwistertiere) definiert. Alle Bewertungen pro Maus und Gruppe wurden summiert und analysiert.

Modifizierter Stabtest

In dieser Arbeit wurde eine modifizierte Version des Standard-Stabtests verwendet (Ogawa et al., 1985, Abramow-Newerly et al., 2006, Dunkelmann et al., 2018), um frühe Veränderungen in der Motorik der SOD1*G93A Mäuse zu detektieren. Die folgenden Modifikationen wurden vorgenommen: Die Mäuse wurden mit dem Kopf nach unten (statt nach oben) am oberen Ende einer vertikalen Stange (Höhe 50 cm, Durchmesser 1,2 cm, angeraute Oberfläche) platziert (Abb. 5 a). Der Fuß der Apparatur wurde vorab in einer Arena der Größe 19,5 cm x 55 cm x 33 cm (H x B x T) platziert und der Boden des Stabes wurde 5 cm hoch mit Streumaterial bedeckt.

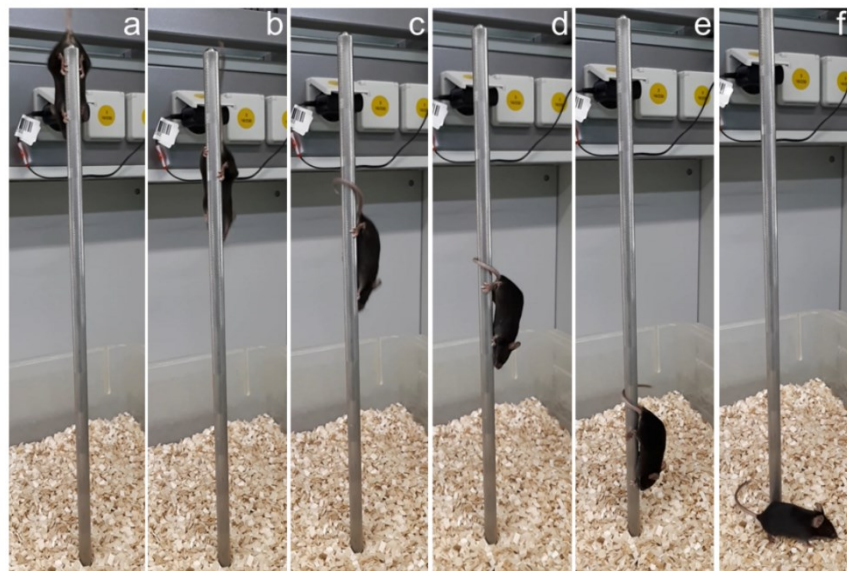


Abb. 5 Modifizierter Stabtest.

Die Tiere wurden an ihrem Schwanz hochgehoben und kopfüber an das obere Ende des 50 cm langen Stabes geführt. Sobald das Tier mit allen vier Pfoten sicher die angeraute Stange griff, wurde es am Schwanz losgelassen. Die Bewertung des Laufverhaltens startet ab dem Loslassen des Mausschwanzes und wurde mit 1 bis 3 Punkten je nach Lauf bewertet. Quelle: J. Post-Schulz

Sobald die Maus die Stange mit allen vier Pfoten umgriff, lief das Tier den Stab entlang nach unten zum Streumaterial (Abb. 5 a - f). Pro Maus gab es insgesamt drei Durchläufe im Abstand von 15 min. Jeder Lauf wurde mit 0 bis 3 Punkten (Pkt) bewertet (0 Pkt.: kontinuierlicher, normaler Lauf, 1 Pkt.: Kombination von normalen Läufen mit teilweiseem Rutschen oder Fallen; 2 Pkt.: kontinuierliches runterrutschen und 3 Pkt.: direktes runterfallen des Tieres). Zur Analyse wurde die Summe der Punkte pro Durchlauf verwendet.

Spreizreflextest der Hinterbeine

Eine weitere Methode zur Untersuchung motorischer Defizite ist der Spreizreflextest (Leitner et al., 2009, Deitch et al., 2014). Im Verlauf der Krankheit kommt es zur Zerstörung der Motorneurone im zentralen Nervensystem, was u.a. zu einer Muskelatrophie bis hin zur vollständigen Parese der Hinterbeine führt. Beim Spreiztest der Hinterbeine wurden die Mäuse am Schwanz gepackt, aus dem Käfig hochgehoben und die Spreizung der Hintergliedmaßen wurde beurteilt (Abb. 6). Eine gesunde Spreizung der Hintergliedmaßen, wie sie bei nicht-transgenen Mäusen beobachtet wurde, erhielt einen Score von 0 Punkten (Abb. 6 a und b). Die „schwache Spreizung“ einer Hintergliedmaße wurde mit einem Score von 1 Punkt bewertet und mit 2 Punkten die „schwache Spreizung“ beider Hinterbeine (Abb. 6 c). Der vollständige Verlust der Spreizung beider Hintergliedmaßen wurde mit einem Score von 3 Punkten bewertet (Abb. 6 d). Dieses Verfahren wurde dreimal durchgeführt, und die Summe aller drei Scorebewertungen wurde für die Analyse verwendet.

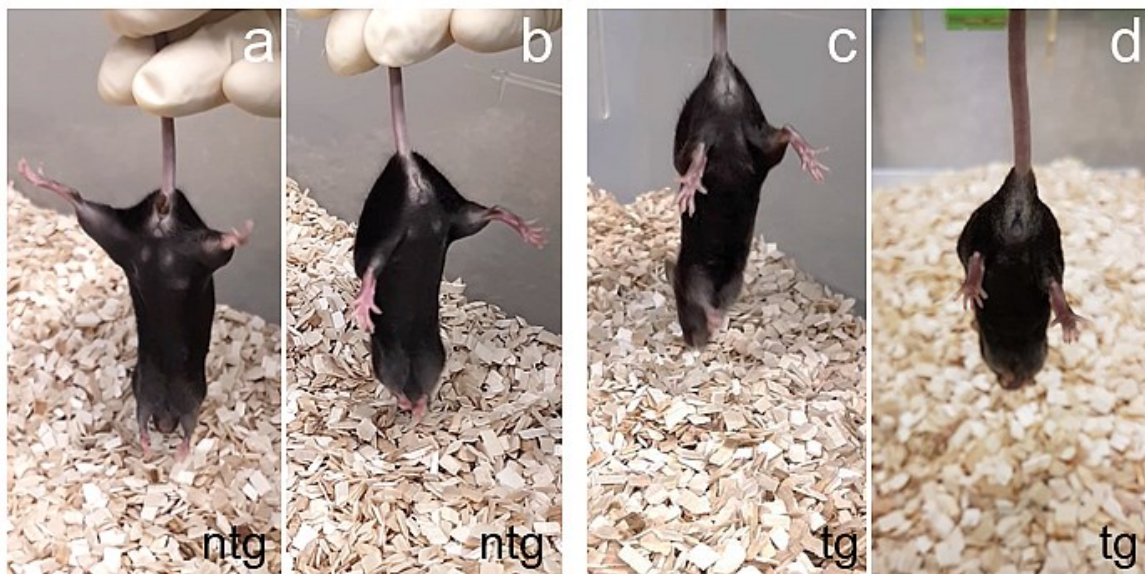


Abb. 6 Spreizreflextest der Hinterbeine.

Für die Beurteilung des Spreizreflexes wurden die Mäuse vorsichtig am Schwanz hochgehoben und einige Zentimeter über den Streuboden in der Luft gehalten. ntg: nicht-transgen, tg: transgen. Quelle: J. Post-Schulz

Greifstärketest

Im Greifstärketest wird die maximale Greifstärke der Vorderpfoten und/oder Hinterpfoten gemessen, die die Tiere einsetzen, um sich an einem Zugsystem festzuhalten (Greifstärkemeter, Ugo Basile, VA, Italien) (Zheng et al., 2004, Lee et al., 2017). In der Charakterisierungsstudie wurde die Greifstärke der Vorderpfoten gemessen. Für die Therapiestudien wurde zusätzlich mit Hilfe eines Greifgitters die Greifstärke der Hinterpfoten gemessen (Abb. 7). Der Testablauf war bei beiden Messungen gleich. Der

Habituierungskäfig wurde neben dem Greifstärkegerät platziert, um die Strecke zwischen Käfig und Gerät zu minimieren. Das Tier wurde an seinem Schwanz aus dem Käfig gehoben und zu dem Zugsystem des Geräts geführt, nach dem das Tier instinktiv greift. Danach wurde das Tier auf die horizontale Ebene gebracht und in einer schnellen, gleichmäßigen Bewegung von dem Zugsystem fortbewegt. Die maximale Greifstärke der Vorder- bzw. Hinterpfoten wurde über einen Signalverstärker innerhalb des Gerätes gemessen, digitalisiert und nachträglich in die Einheit Newton umgerechnet. Zwischen den Messungen hatten die Tiere jeweils 15 Minuten Zeit zur Erholung.

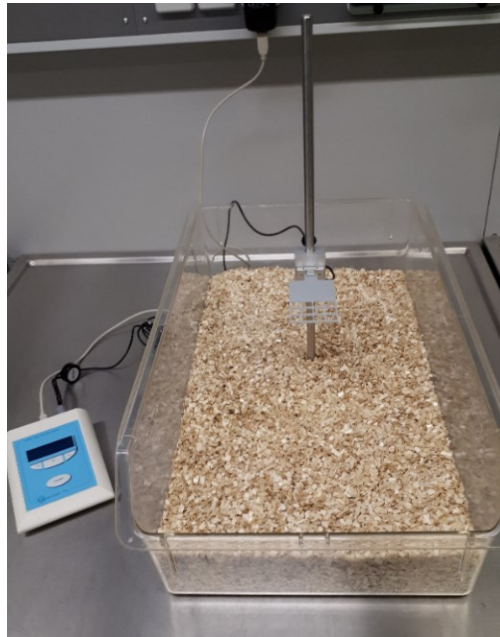


Abb. 7 Versuchsaufbau zum Messen der Greifstärke.

Mithilfe des Greifstärkemeters wird die neuromuskuläre Kraft der Mäuse in den Extremitäten gemessen. Die Maus greift beim Zurückziehen reflexartig nach dem Greifgitter. Wenn die nach hinten ziehende Kraft die Muskelkraft der Maus übersteigt, lässt das Tier das Gitter los. Die eingesetzte Kraft wird über einen Signalverstärker an das Greifstärkemeter übertragen und kann auf der Digitalanzeige abgelesen werden. In der Abbildung ist exemplarische der Aufbau zur Messung der Muskelkraft in den Hinterbeinen der Mäuse gezeigt. Quelle: J. Post-Schulz

Rotarod-Test

Zur Beurteilung der motorischen Koordination und des Gleichgewichts der Tiere wurde der Rotarod-Test durchgeführt (Mead et al., 2011). Die Tiere liefen auf einem rotierenden Stab (Rotarod; engl. *rotating rod*) mit einer kontinuierlichen Beschleunigung (Abb. 8). Es wurde die Zeit gemessen, die sich jede einzelne Maus auf dem rotierenden Stab hielt (Latenzzeit). Die Zeit wurde gestoppt sobald das Tier herunterfiel oder Ermüdungserscheinungen des Tieres sichtbar wurden, z.B. die Rotation des Tieres mit dem Stab aufgrund des Festhaltens mit den Vorderpfoten, Springen oder seitliches hin- und her laufen zwischen den

Trennwänden. Mit der verwendeten Apparatur der Firma Ugo Basile (Gemonio VA, Italien) wurden simultan 5 Tiere getestet. Vor der ersten Testung wurden die Mäuse an drei aufeinanderfolgenden Tagen darauf trainiert, mindestens 60 s, 120 s und 180 s bei einer konstanten Geschwindigkeit von 10 Umdrehungen pro Minute (upm) in einer Blickrichtung auf dem rotierenden Stab zu laufen. Erfüllte ein Tier diese Kriterien nicht, wurde es aus dem Versuch genommen. Am vierten Tag wurden die Tiere zum ersten Mal im Rotarod-Versuch getestet. Ein Versuchstag bestand aus zwei Testsitzungen. Je eine Sitzung fand am Vormittag und Nachmittag statt, welche in drei Durchläufen von je 5 min und in einem Abstand von je 30 min unterteilt waren. Zwischen den Sitzungen hatten die Tiere eine dreistündige Erholungsphase im eignen Käfig. Während der 5-minütigen Testung stieg die Rotationsgeschwindigkeit kontinuierlich von 4 upm auf 40 upm an. Die minimale Zeitspanne, die ein Tier auf dem Rotarod laufen musste für die Aufzeichnung der Rotarod-Aktivität, lag bei 5 s. War dies dem Tier aufgrund seiner motorischen Defizite nicht möglich, wurde der Durchlauf mit 0 s bewertet. Die gemessene Latenzzeit jedes Durchlaufs pro Maus wurde zur Analyse der motorischen Leistung verwendet, wobei die maximale Zeit 300 s betrug.

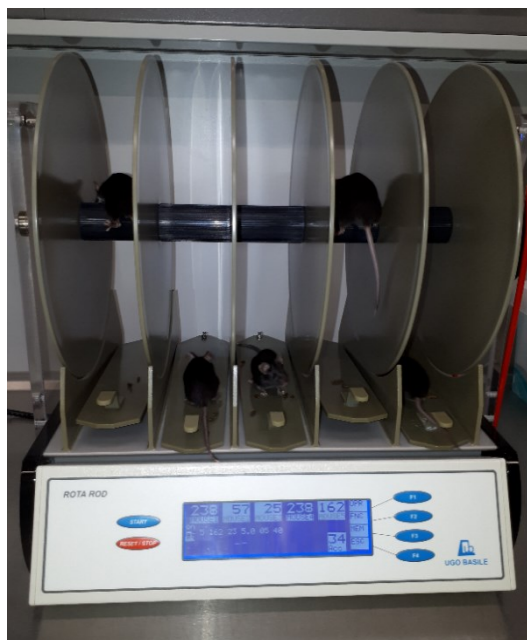


Abb. 8 Rotarod-Test.

Im Rotarod-Test wird die motorische Koordination getestet. Die Mäuse werden auf einen Stab gesetzt, der mit Versuchsstart beginnt zu rotieren. Mit der Zeit (max. 300 s) nimmt die Rotation von 4 upm auf 40 upm zu. Wenn ein Tier herunterfällt, löst es die Kontaktplatte aus und die Zeit für das Tier wird gestoppt. Auf der Digitalanzeige kann die Latenzzeit in s abgelesen werden. Zeitgleich können fünf Mäuse getestet werden. Bevor der nächste Versuchsdurchlauf mit neuen Tieren startet, wird das Gerät gesäubert. Quelle: J. Post-Schulz

Ganganalyse im Fußabdrucktest

Diese Analyse der Gangart im sogenannten Fußabdrucktest dient der Kontrolle der motorischen Fähigkeiten der Tiere. Dazu wurden die Vorder- und Hinterpfoten der Mäuse mit verschiedenfarbiger, ungiftiger und wasserlöslicher Farbe (Fingermalfarben, Eberhard Faber, Stein, Deutschland), markiert (Vorderpfoten: rot und Hinterpfoten: schwarz). Die Mäuse wurden am Schwanz vom Boden hochgehoben und griffen intuitiv nach zwei mit Farbe versetzten Wattestäbchen, wodurch sich die Farbe an den Pfoten verteilte. Danach wurden die Tiere vor einen 25 cm langen und 10 cm breiten Tunnel gesetzt, dessen Boden mit einem DIN A4 Blatt Papier ausgelegt war (Abb. 9 a). Der Tunnel führte in eine dunkle Box in der ein Lockmittel (Kellogg's Fruit Loops) zur Belohnung platziert war. Die beim Durchqueren des Tunnels hinterlassenen Farbabdrücke wurden nach *Jaworski et al.* (2006) analysiert (Jaworski et al., 2006) (Abb. 9 b). Folgende Parameter wurden untersucht: 1. die Schrittlänge, d.h. der mittlere Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Abdrücken der linken bzw. der rechten Vorder- zur Hinterpfote, 2. die Zwischenschrittlänge, d.h. der diagonale Abstand zwischen der linken und rechten Vorder- bzw. Hinterpfote, 3. die Gangbasis, d.h. Abstand zwischen der Vorder- und Hinterpfote der linken und rechten Körperseite, was Aufschluss über Veränderungen des Gangbildes gibt und 4. die Schrittzahl, d.h. gesamte Anzahl der Schritte die benötigt wurden bis zum Ende der Teststrecke. Für eine einheitliche Auswertung wurden die ersten 5 cm der gelaufenen Strecke nicht in der Analyse berücksichtigt, da einige Tiere nach dem Absetzen mit schnellem Fortlaufen oder einem Sprung reagierten. Die analysierte Laufstrecke betrug insgesamt 20 cm.

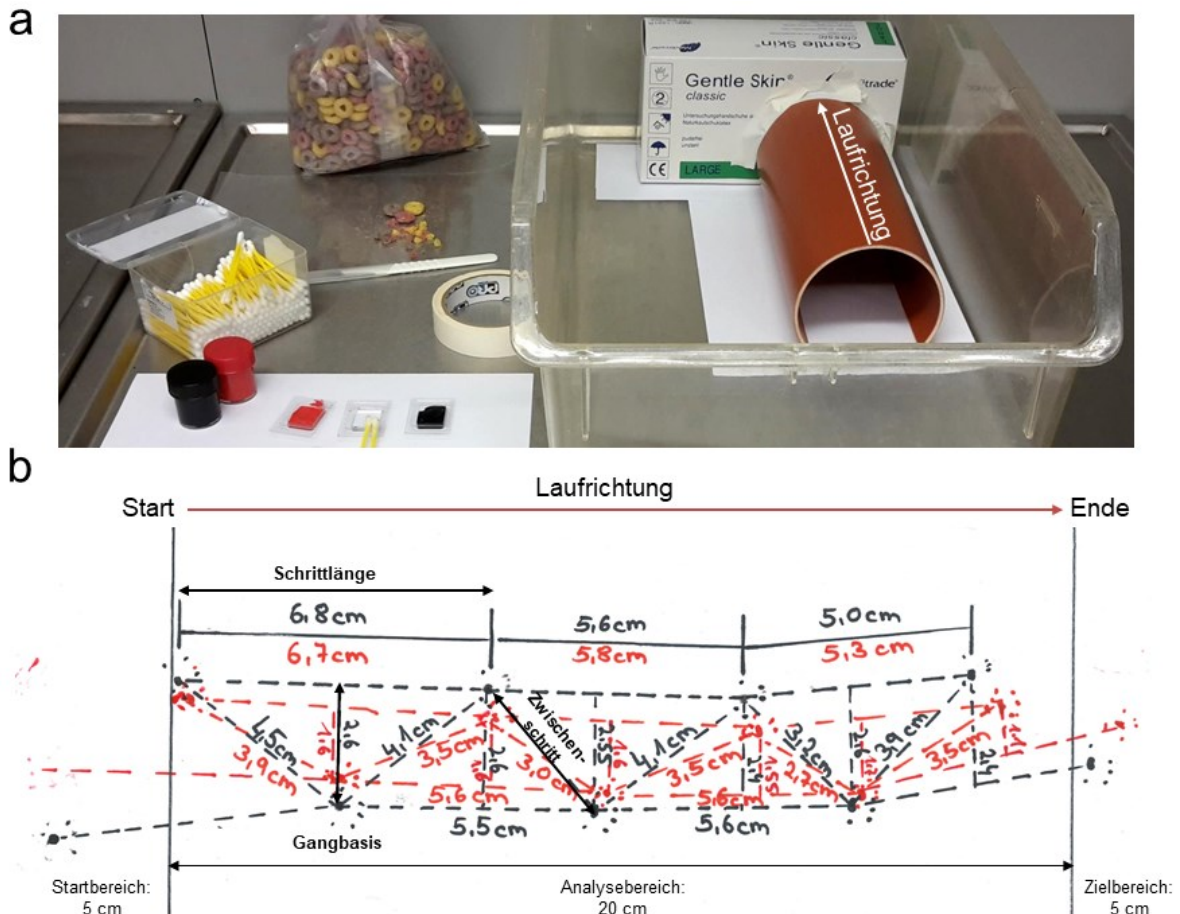


Abb. 9 Fußabdrucktest zur Analyse der Gangart.

Die obere Abbildung zeigt den Versuchsaufbau und die verwendeten Materialien (Abb. 9 a). Die Maus läuft mit farbig markierten Pfoten (Vorderpfoten: rot und Hinterpfoten: schwarz) durch einen 25 cm langen Tunnel über das Blatt Papier. Die beim Laufen entstandenen Pfotenabdrücke werden verwendet, um die Schrittlänge der Vorder- und Hinterpfoten, die Zwischenschrittlänge von den Vorder- bzw. Hinterpfoten der linken und rechten Körperhälfte, die Gangbasis und die Schrittzahl zu analysieren. Die untere Abbildung zeigt eine exemplarische Auswertung (Abb. 9 b). Quelle: J. Post-Schulz

Analyse des Krankheitsbeginns und des Überlebens

Um den Krankheitsverlauf der SOD1*G93A Mäuse zu überwachen, wurden alle Tiere täglich auf Anzeichen von motorischen Defiziten untersucht. Der Krankheitsbeginn wurde nach Mead et al. (Mead et al., 2011) bestimmt, wenn die folgenden Kriterien erfüllt waren: "Zeitpunkt, an dem die Defekte in der Spreizung der Hintergliedmaßen und ein verstärkter Tremor mit einem Score von mindestens 1 Punkt in jeder Kategorie beobachtet wurden". In der kurativen Therapiestudie wurde zudem eine Überlebenszeitanalyse der SOD1*G93A Mäuse durchgeführt. Die transgenen SOD1*G93A Mäusen wurden bis zum Erreichen definierter Abbruchkriterien behandelt (abnormale Körperhaltung, absolute Abwesenheit

des Spreizreflexes und schwere Lähmung der Hintergliedmaßen, mehr als 10 % Gewichtsverlust über 48 h oder Verlust des Aufrichtreflexes innerhalb von 10 s), analog dem durch das LANUV genehmigten Beurteilungsbogen (Scoresheet). Die Behandlung der nicht-transgenen Gruppen wurde eine Woche länger fortgesetzt als das letzte transgene Tier lebte.

Magnetresonanztomographie des *M. gastrocnemius*

Der Zwillingswadenmuskel (latein. *M. gastrocnemius*) ist ein Skelettmuskel der Unterschenkelmuskulatur, der der Wade die typische Form gibt und für die Flexion des Knie- und oberem Sprunggelenks verantwortlich ist (Mohan et al., 2014). Während des Krankheitsverlaufes werden die motorischen Nervenbahnen geschädigt, spinale Motoneuronen erleiden den Zelltod und Muskelfasern denervieren. Die Folge ist die Atrophie der Hinterbeinmuskulatur, wodurch sich das Volumen der Muskeln reduziert (Mohajeri et al., 1998, Bruijn et al., 2004, Nijssen et al., 2017).

Zur Darstellung des *M. gastrocnemius* und dem Nachweis des Muskelabbaus im Zuge des Krankheitsverlaufes wurde eine Magnetresonanztomographie (MRT)-Messung durchgeführt. Im Alter von 10 Wochen wurde das Muskelvolumen des *M. gastrocnemius* mit einer T1-gewichteten MRT-Messung von transgenen und nicht-transgenen Mäusen bestimmt. Die Messung wurde am Institut für Neurowissenschaften und Medizin in der Abteilung Physik der Medizinischen Bildgebung (INM-4) zusammen mit Dr. Philip Lohmann durchgeführt. Für die Messungen wurde ein 9,4 Tesla Kleintier-MRT verwendet, dass mit einer Siemens-Konsole (Erlangen, Deutschland) ausgestattet. Die installierte Gradientenspule (Varian Inc., Palo Alto, CA, US) erlaubte eine maximale Gradientenstärke von 600 mT/m pro Achse. Das Protokoll umfasste die folgende Sequenz mit einer Schichtdicke von 1,5 mm (Spin-Gitter Relaxationszeit (T1), Voxel res. 0,46875 mm, 0,46875 mm. 1,5 mm, Field of View (FOV) 256 x 256 mm, Repetitionszeit (TR) 2190 ms, Echozeit (TE) 25 ms, Flipwinkel 180°). Die Tiere wurden mittels Inhalationsnarkose mit 1,5 % bis 3 % Isofluran betäubt. Die MRT-Messung dauerte 30 min bis 60 min. Für eine präzise Aufnahme des Muskels wurden die Tiere während der Messung auf die linke Körperseite gelegt und der rechte Fuß wurde am Schwanz der Maus fixiert. Letzteres wurde zur Verhinderung von Bewegungen des Tieres in der Narkose gemacht, da Bewegungen während einer MRT-Messung zu nicht verwertbaren (verwackelten) Aufnahmen führen. In der ersten Messung (mit 10 Wochen) wurde der *M. gastrocnemius* aller 28 Tiere (ntg = 14 und tg = 14) vermessen. Danach wurde die Hälfte der Tiere (tg und ntg je n = 7) durch zervikale Dislokation getötet und der *M. gastrocnemius* entnommen. Insgesamt wurden axial 40 Schnittbilder durch den *M. gastrocnemius* mit der Software PMOD (PMOD

Technologies LLC, Zürich, Schweiz) angefertigt. Die Analyse der Daten wurden mit dem Programm ImageJ, Version 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) durchgeführt (Schneider et al., 2012). Die geplante zweite Messung im Alter von 20 Wochen konnte wegen eines Betriebsausfalls des MRT nicht durchgeführt werden.

4.1.3 Peptid

In der letzten Therapiestudie wurde das L-Peptid RD2RD2 (Sequenz: PTLHTHNRRRRRPTLHTHNRRRRR, Molekulargewicht 3,18 kDa) verwendet. L-RD2RD2 besteht aus 24 L-enantiomeren Aminosäureresten mit einem amidierten C-Terminus und wurde von der Firma CBL Patras (Patras, Griechenland) synthetisiert.

4.1.4 Genotypisierung

Der Genotyp aller Mäuse wurde in einer quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR; engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction*) bestimmt. Spezifische Primer mit fluoreszenzmarkierten Sonden wurden verwendet, um die DNA Proben auf das Vorhandensein und die Anzahl der Genkopien der humanen SOD1*G93A Mutation in den Mäusen zu untersuchen. Alexander et al. (2004) zeigten, dass die Anzahl der Genkopien der humanen SOD1*G93A Mutation einen Einfluss auf die Krankheitsprogression der SOD1*G93A Mäuse hat (Alexander et al., 2004). Ein relatives Maß zur Bestimmung der Anzahl an Genkopien eines Transgens ist der delta-C_t (ΔC_t ; engl. *threshold cycle*)-Wert, indem der Unterschied im Schwellenwert (ΔC_t) zwischen dem Transgen und einem Referenzgen in der qRT-PCR bestimmt wird, wie z.B. für das humane Transgen SOD1*G93A in der Maus (Alexander et al., 2004). Der ΔC_t wurde für die stratifizierte Randomisierung der transgenen Mäuse in zwei gleichstarke Behandlungsgruppen verwendet (Kapitel 4.1.2).

Die Isolierung und Aufreinigung der DNA wurde gemäß den Herstellerangaben des *my-Budget* DNA Mini Kits (Bio-Budget Technologies, Krefeld, Deutschland) durchgeführt. Es wurden DNA Proben von Ohrmarkierungen verwendet, die von den Mitarbeitern der zentralen Tierhaltung zur Verfügung gestellt wurden.

Der benötigte Reaktionsansatz für die qRT-PCR wurde nach der Angabe der Firma *The Jackson Laboratory* hergestellt (JAX, stock #004435, Protocol 30009, Version 5.0). Die erforderlichen Primer wurden von der Firma BioTez Berlin-Buch (Biochemisches-Technologisches Zentrum, Berlin, Deutschland) synthetisiert (Tab. 3) und zu einem gebrauchsfertigen Mastermix (Kapa Probe Fast qPCR, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) pipettiert. Das murine Apolipoprotein B wurde in der qRT-PCR als interne Kontrolle eingesetzt (Liu et al., 2003).

Tab. 3 Sequenzen verwendeter Primer für die qRT-PCR.

6-FAM: 6-Carboxyfluorescein, HEX: Hexachlorofluorescein, BHQ: Black Hole Quencher

Primer	Sequenz (5' → 3')
hSOD1 Transgen <i>forward</i>	GGG AAG CTG TTG TCC CAA G
hSOD1 Transgen <i>reverse</i>	CAA GGG GAG GTA AAA GAG AGC
[Fluorophor]-hSOD1 Transgen-[Quencher]	[6-FAM]-CTG CAT CTG GTT CTT GCA AAA CAC CA-[BHQ-1]
Interne Kontrolle <i>forward</i>	CAC GTG GGC TCC AGC ATT
Interne Kontrolle <i>reverse</i>	TCA CCA GTC ATT TCT GCC TTT G
[Fluorophor]-Interne Kontrolle-[Quencher]	[HEX]-CCA ATG GTC GGG CAC TGC TCA A-[BHQ-2]

Der finale Reaktionsansatz zur Analyse einer DNA Probe bestand aus 7 µL der Primer-Mastermix-Lösung und 5 µL der aufgereinigten DNA (12 µL Gesamtvolumen pro Reaktion). Für jede zu untersuchende Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde in den Thermocycler CFX96 RealTime System C1000 (Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland) gegeben und das entsprechende Programm gestartet (Tab. 4).

Tab. 4 Programm der SOD1 qRT-PCR.

Die Reihenfolge der einzelnen Reaktionsschritte mit Berücksichtigung der Temperatur und Dauer jedes Reaktionsschrittes.

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Initiale DNA-Denaturierung	95 °C	300 s	1 x
Denaturierung	95 °C	30 s	35 x
Annealing	65 °C	30 s	
Extension	72 °C	45 s	
Finale Amplifikation	72 °C	180 s	1 x
Abkühlung	4 °C	∞	

Anschließend wurden die Daten mit dem Programm Bio-Rad CFX Manager (Version 3.1, Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland) ausgewertet. Die Ergebnisse von „transgen“ identifizierten Mäusen wurden zur Quantifizierung des ΔC_T -Wertes herangezogen und zusammen mit einer eingesetzten Referenzprobe ausgewertet (Ohgomori et al., 2017).

4.1.5 Plasma

Sobald die Abbruchkriterien erreicht wurden, kam es in der kurativen Therapiestudie zur Entnahme der Blutproben per Herzpunktion. Die Blutproben wurden in ein EDTA-K₃ beschichtetes Röhrchen (Microvette 500, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) überführt und für 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand (Plasma) wurde bei - 80 °C gelagert.

Die biochemische Analyse der Plasmaproben auf verschiedene Entzündungsmarker sollte mit einem Multiplex-Immunoassay (Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Assay, 23-plex, Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland) analysiert werden wie in *Post et al.* (2021) beschrieben (Kapitel 3.2). Nach der Feststellung, dass es sich bei der Testsubstanz um ein L-Peptid handelte, wurde diese Analyse nicht durchgeführt.

4.1.6 Organpräparation und Aufarbeitung des Gewebes

Am Ende der Studien bzw. nach der ersten MRT-Messung wurden die SOD1*G93A Mäuse und ihre nicht-transgenen Geschwistertiere per zervikaler Dislokation getötet. Zur Verifizierung des vor den Studien ermittelten Genotyps wurde erneut eine Schwanzbiopsie genommen und diese in einer qRT-PCR analysiert wie im Kapitel 4.1.4 beschrieben. Von allen Mäusen wurde das Gehirn und der rechte *M. gastrocnemius* entnommen. Das Gewicht des *M. gastrocnemius* wurde nach der Entnahme mittels einer Feinwaage gewogen. Alle Gewebeproben wurden für die spätere Nutzung in Isopentan schockgefrostet und bei - 80 °C weggefroren. Die Hirn- und Muskelproben aus der Charakterisierungsstudie wurden zur Etablierung histologischer Färbemethoden verwendet und mit einem Kryotom (Leica Biosystems Nussloch, Wetzlar, Deutschland) sagittal 20 µm bzw. transversal 12 µm dick geschnitten. Dafür wurden die Organproben auf einem Halter mit Gewebekleber fixiert und im Kryostaten befestigt. Die angefertigten Kryoschnitte wurden auf einen Objektträger aufgenommen, bei 37 °C auf einer Heizplatte getrocknet und anschließend bei - 80 °C gelagert. Am Ende der Therapiestudie wurde zusätzlich noch das Rückenmark entnommen. Für die immunhistologische Analyse wurden 12 µm Transversalschnitte des lumbalen Rückenmarks (L1-L5 Trakt) angefertigt nach demselben Ablauf wie oben beschrieben. Die lumbale Region des Rückenmarks wurde wie zuvor beschrieben identifiziert (Tadros et al., 2012, Hugnot, 2013).

4.1.7 Immunhistochemie

Die Gewebeproben von Hirn und Rückenmark der vier Behandlungsgruppen aus der kurativen Therapiestudie wurden histologisch auf eine Gliose und Neurodegeneration

untersucht wie im Manuskript Kapitel 3.1 beschrieben. Ergänzend wurde die Anzahl an cholinergen Neuronen in den Gewebeproben von Hirnschnitten der präventiven p.o. Therapiestudie quantifiziert (Manuskript Kapitel 3.2). Die immunhistochemischen Analysen wurden wie vorher beschrieben durchgeführt (Manuskripte Kapitel 3.1 und 3.2).

4.1.8 Statistische Auswertungen

Die statistische Analyse wurde mit den Programmen InVivoStat Version 3.5 (Clark et al., 2012, Bate and Clark, 2014) und SigmaPlot Version 11 (Systat Software, Deutschland) durchgeführt. Für die grafische Darstellung der Daten wurde das Programm GraphPad Prism Version 8 (GraphPad Software Inc., USA) verwendet. Die Normalverteilung der Daten wurde je nach Programm entweder in einem „Normality Probability Plot“ (InVivoStat) oder mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Normalitätstests analysiert (SigmaPlot). Zum Vergleich von zwei Gruppen (Charakterisierungsstudie) mit normalverteilten Daten wurde der ungepaarte t-Test genutzt. Im Fall von metrisch nicht normalverteilten Daten von zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. Der gepaarte t-Test wurde für die Analyse verbundener Stichproben verwendet, d.h. zum Vergleich der Ergebnisse innerhalb der Versuchsgruppe bestehend aus denselben nicht-transgenen bzw. transgenen Mäusen.

Die zweifaktorielle wiederholte Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Fisher's Least Significant Difference (LSD) Post-hoc-Test für normalverteilte Daten wurde angewandt, um die Unterschiede zwischen den Parametern der nicht-transgenen und transgenen Gruppen über einen bestimmten Zeitraum zu bewerten (Therapiestudie). Post-hoc-Tests vergleichen die Unterschiede zwischen den Mittelwerten verschiedener Behandlungsgruppen, um signifikante Unterschiede zu differenzieren. Die Ergebnisse der histochemischen Analyse (Quantifizierung) wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA mit dem Fisher's LSD Post-hoc-Test analysiert. Die statistischen Analysen vom Krankheitsbeginn und der Überlebenszeit wurden mit dem Kaplan-Meier-Verfahren mit Log-Rank-Test durchgeführt. Der Log-Rank-Test untersucht, ob sich die Überlebenszeit mehrerer Gruppen unterscheidet. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardfehler (SEM) dargestellt. Ein p-Wert von $\geq 0,05$ wurde als nicht signifikant (ns) angesehen.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Charakterisierung des transgenen SOD1*G93A Mausmodells

Die Etablierung der Mauslinie durch die phänotypische Charakterisierung des transgenen SOD1*G93A Mausmodells war das erste Ziel dieser Arbeit. Zur Charakterisierung wurden transgene SOD1*G93A Mäuse und nicht-transgene Geschwistertiere in regelmäßigen Abständen (alle zwei Wochen) in verschiedenen Verhaltens- und motorischen Tests ab einem Alter von vier Wochen untersucht.

4.2.1.1 Primäre Verhaltensanalysen

Offenfeldtest

Im Offenfeldtest wurde das Verhalten und die motorische Aktivität der Tiere während der Progression des Phänotyps evaluiert. Im Rahmen der 30-minütigen Testphase wurden die Bewegungen der Tiere über eine Kamera aufgenommen und die Parameter Geschwindigkeit (cm/s), zurückgelegte Distanz (cm) und Explorationszeit (s) ausgewertet. Die Analyse der Daten zeigte keinen Effekt des Genotyps auf die motorische Leistung (Geschwindigkeit und Distanz) der transgenen SOD1*G93A Mäuse im Vergleich zur nicht-transgenen Gruppe bis zu einem Alter von 18 Wochen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der motorischen Leistung mit Ausnahme der gelaufenen Geschwindigkeit in Testwoche 6 detektiert (Abb. 10 a, t-Test, $t(26) = 2,098$; ntg vs. tg $p = 0,046$). In der letzten Testung im Alter von 20 Wochen liefen die nicht-transgenen Mäuse signifikant schneller in der Arena umher und signifikant eine längere Distanz im Vergleich zu den transgenen SOD1*G93A Geschwistertieren (Abb. 10 a, Geschwindigkeit, t-Test, $t(12) = 4,186$; ntg vs. tg $p = 0,001$ und Abb. 10 b, Distanz, t-Test, $t(12) = 3,241$; ntg vs. tg $p = 0,007$). Die Explorationszeit ist als Zeit, die die Tiere in der inneren Zone (Zentrum) oder in der äußeren Zone (Randbereich) verbrachten, definiert. An zwei Versuchstagen wurde ein Unterschied in der Explorationszeit zwischen den beiden Versuchsgruppen detektiert. Im Alter von 8 und 18 Wochen verbrachten die SOD1*G93A Mäuse signifikant mehr Zeit im Randbereich als die nicht-transgenen Tiere (Abb. 10 c, Explorationszeit, t-Test, Woche 8: $t(26) = -2,3$; ntg vs. tg $p = 0,030$ und Woche 18: $t(12) = -2,637$; ntg vs. tg $p = 0,022$). Insgesamt wurde ein Anstieg der Explorationszeit im Randbereich von beiden Versuchsgruppen über die Versuchsdauer von 16 Wochen beobachtet (Abb. 10 c, ntg Woche 4: Zentrum = 269 s und Randbereich = 1531 s vs. ntg Woche 20: Zentrum = 155 s und Randbereich = 1645 s; tg Woche 4: Zentrum = 264 s und Randbereich = 1536 s vs. tg Woche 20: Zentrum = 152 s und Randbereich = 1648 s). Die nicht-transgenen Mäuse hielten sich signifikant länger im Randbereich als im Zentrum der Arena im Vergleich der

ersten und letzten Testung auf (t-Test, ntg Woche 4 vs. Woche 20: $t(19) = -2,762$; $p = 0,012$ und tg Woche 4 vs. Woche 20: $t(19) = -2,292$; $p = 0,034$). Darüber hinaus zeigten die transgenen SOD1*G93A Mäuse keine Auffälligkeiten im explorativen Verhalten (Abb. 10 c, Explorationszeit).

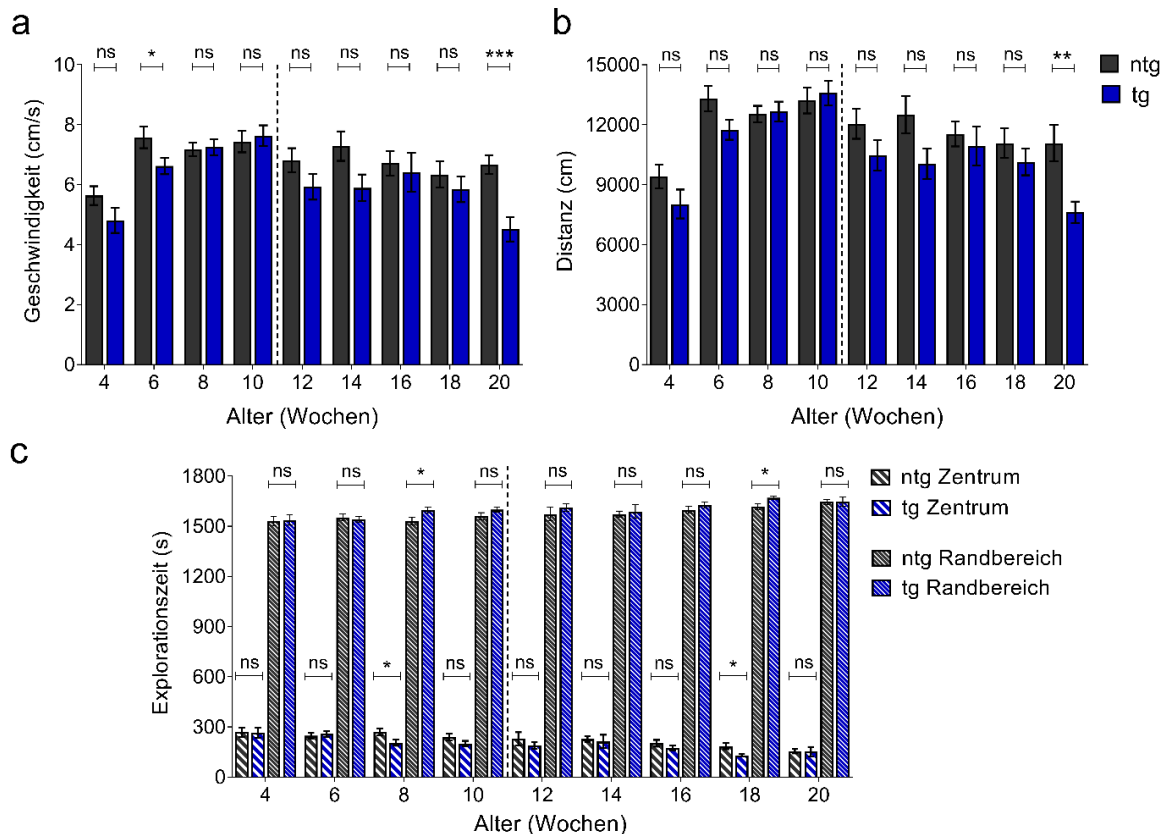


Abb. 10 Verhaltensanalyse des SOD1*G93A Mausmodells im Offenfeldtest.

Die Analyse der Geschwindigkeit (a) und der zurückgelegten Distanz (b) zeigte nach 16 Wochen Versuchsdauer einen Unterschied in der motorischen Aktivität von transgenen SOD1*G93A Mäusen zu nicht-transgenen Geschwistertieren. Die Explorationszeit (c) von beiden Versuchsgruppen im Zentrum bzw. Randbereich der Arena unterschied sich nicht, was darauf schließen ließ, dass es keinen Genotypeffekt auf das Verhalten gab. Die gestrichelte Linie gibt die zeitliche Veränderung der Anzahl pro Versuchsgruppen wieder (Versuchszeitpunkte 4 bis 10 Wochen: ntg und tg je $n = 14$ und Versuchszeitpunkte 12 bis 20 Wochen: ntg und tg je $n = 7$). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels t-Test durchgeführt. Sternchen (*) zeigen eine Signifikanz zwischen der nicht-transgenen und transgenen Versuchsgruppe; $p < 0,05$. Ein p-Wert von $\geq 0,05$ wurde als statistisch nicht signifikant (ns) angesehen. ntg: nicht-transgen, tg: transgen

Diese Daten ließen die Schlussfolgerung zu, dass das Verhalten der transgenen SOD1*Mäuse dem der nicht-transgenen Geschwistertiere entsprach, trotz zunehmender motorischer Beeinträchtigung. Des Weiteren ließen die Daten zum explorativen Verhalten der nicht-transgenen Versuchstiere darauf schließen, dass die hohe Testfrequenz dazu

fürte, dass sich die Mäuse innerhalb der Versuchsdauer von 16 Wochen an die Testarena gewöhnt hatten. Zusammenfassend konnte für die Charakterisierung des transgenen SOD1*G93A Phänotyps gezeigt werden, dass trotz einiger abweichender Verhaltensweisen der SOD1*G93A Mäuse im Offenfeldtest, keine statistisch entscheidenden Verhaltensänderungen mit der Progression der Krankheit impliziert sind.

Analyse des Körpergewichts und SHIRPA-Tests

Für das SOD1*G93A Mausmodell ist bekannt, dass es während der Krankheitsprogression zur Reduzierung des Körpergewichts kommt (Weydt et al., 2003, Apolloni et al., 2013, Kreilaus et al., 2020). Ein weiteres Merkmal ist, dass es einen Gewichtsunterschied zwischen gesunden, d.h. vor Ausbruch der ALS Symptomatik, adulten transgenen und nicht-transgenen Tieren gibt, bei dem die transgenen Mäuse weniger als die nicht-transgenen Geschwistertiere wiegen (Miana-Mena et al., 2005, Hayworth and Gonzalez-Lima, 2009).

Beide Versuchsgruppen nahmen während der ersten sechs Versuchswochen stetig an Körpergewicht zu. Ab dem Alter von 10 Wochen stieg das Körpergewicht der transgenen SOD1*G93A Mäuse langsamer als die Wochen zuvor an, während die nicht-transgenen Tiere weiter deutlich an Körpergewicht zunahmen. Ab dem Alter von 14 Wochen bis zum Ende der Studie wogen die nicht-transgenen Tiere signifikant mehr als die transgenen SOD1*G93A Geschwistertiere (Abb. 11 a; t-Test, Woche 14: $t(12) = 2,851$; $p = 0,015$ und Woche 20: $t(12) = 4,98$; $p < 0,001$). Mit 15 Wochen stagnierte das Körpergewicht der SOD1*G93A Mäuse bis zum Alter von 20 Wochen im Durchschnitt bei $19,18 \text{ g} \pm 0,12 \text{ g}$, während die nicht-transgenen Mäuse im Durchschnitt $21,12 \text{ g} \pm 0,16 \text{ g}$ wogen und wöchentlich an Gewicht zunahmen (Abb. 11 a).

Im SHIRPA-Test wurde eine quantitative Aussage zum Allgemeinzustand der Mäuse getroffen anhand der Beobachtung und Bewertung vom Aussehen, der Motorik und dem Verhalten der Mäuse, bezogen auf der im Kapitel 4.1.2 aufgeführten Untertests. Je höher der SHIRPA-Score ausfiel, desto differentieller war das Verhalten der transgenen Mäuse in den einzelnen Kriterien in Bezug zu den nicht-transgenen Geschwistertieren. Ab der ersten Versuchswoche entwickelten die transgenen SOD1*G93A Mäuse signifikant Defizite im Vergleich zur nicht-transgenen Gruppe (Abb. 11 b, SHIRPA, t-Test, Woche 4: $t(26) = -3,309$; $p = 0,003$). Im Verlauf der Zeit prägten sich die Verhaltens- und Motordefizite der SOD1*G93A Mäuse weiter aus.

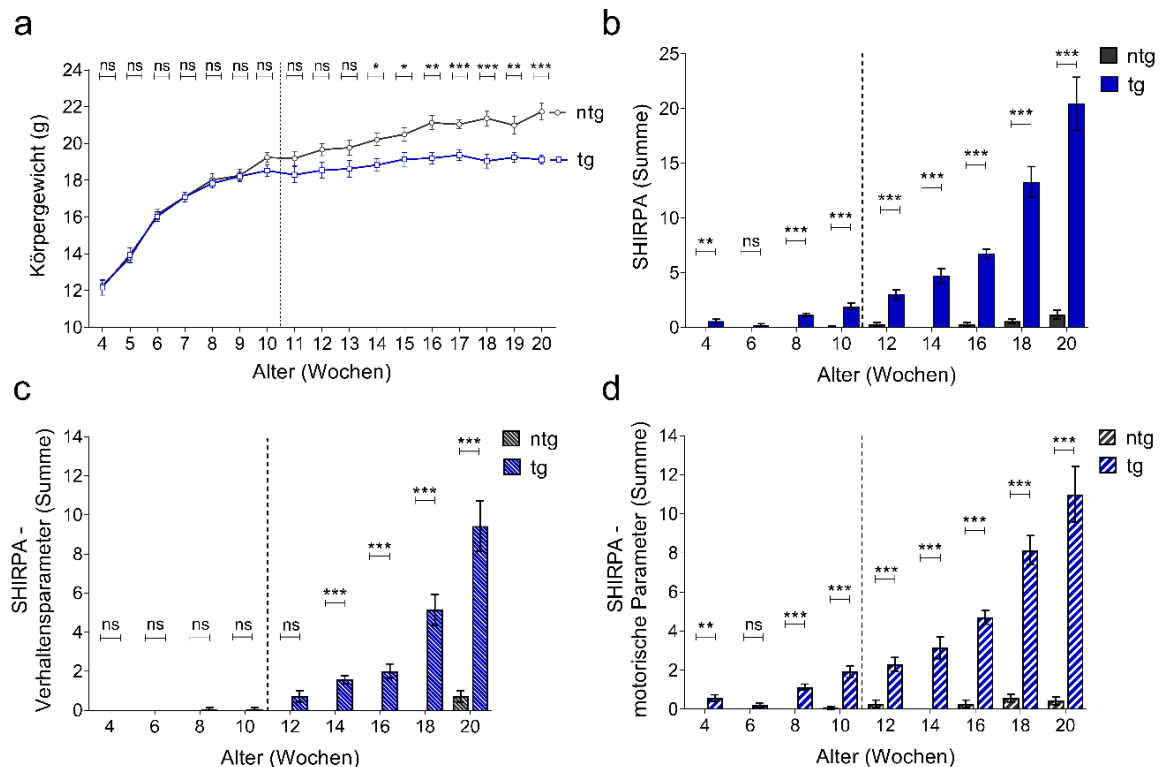


Abb. 11 Primäre Untersuchung des Körpergewichts und Beurteilung im SHIRPA-Test.

Die Veränderungen des Körpergewichts über die Zeit wurde detektiert und beide Versuchsgruppen pro Testzeitpunkt miteinander verglichen (a). Die Untersuchung des Phänotyps wurde mit der SHIRPA-Testbatterie durchgeführt (b). Die Unterteilung der SHIRPA-Parameter ergab zusätzliche Informationen zum Verhalten und die motorische Leistung der transgenen SOD1*G93A Mäuse während der Progression der Krankheit (c und d). Die gestrichelte Linie gibt die zeitliche Veränderung der Anzahl pro Versuchsgruppen wieder (Versuchszeitpunkte 4 bis 10 Wochen: ntg und tg je n = 14 und Versuchszeitpunkte 12 bis 20 Wochen: ntg und tg je n = 7). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels t-Test durchgeführt. Sternchen (*) zeigen eine Signifikanz zwischen der nicht-transgenen und transgenen Versuchsgruppe; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$. Ein p-Wert von $\geq 0,05$ wurde als statistisch nicht signifikant (ns) angesehen. ntg: nicht-transgen, tg: transgen

Da im Offenfeldtest keine signifikante Änderung im explorativen Verhalten der SOD1*G93A Mäuse festgestellt wurde im Gegensatz zur motorischen Aktivität der Tiere, wurde der SHIRPA-Test nach den Parametern Verhalten und motorische Leistung separiert und analysiert (Abb. 11 c und d). Die Analyse der einzelnen Parameter ergab, dass die ermittelten signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen SOD1*G93A und nicht-transgenen Geschwistertieren der ersten vier Untersuchungen im SHIRPA-Test im Alter von 4 bis 10 Wochen im Wesentlichen auf Scorepunkte der motorischen Parameter basierten. Ab dem Alter von 12 Wochen zeigten die transgenen SOD1*G93A Mäusen erste deutliche Verhaltensänderungen im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren,

welche ab der nächsten Testung im Alter von 14 Wochen bis Versuchsende signifikant auffälliger wurden (Abb. 11 c, SHIRPA - Verhaltensparameter, t-Test, Woche 14: $t(12) = -7,778$; $p < 0,001$). Defizite der motorischen Leistung transgener SOD1*G93A Mäuse wurden dagegen frühzeitig im SHIRPA-Test detektiert. Verglichen mit den nicht-transgenen Geschwistertieren nahm die motorische Leistung der transgenen Tiere ab einem Alter von 8 Wochen signifikant ab (Abb. 11 d, SHIRPA - motorische Parameter, t-Test, Woche 8: $t(26) = -8,0$; $p < 0,001$). In den Untertests Greif- und Streckreflex, sowie der Fähigkeit einen Klimmzug zu absolvieren, zeigten die transgenen Mäuse frühzeitig Defizite, die zu mind. einem Bewertungspunkt führten. Während der gesamten Testung zeigten die nicht-transgenen Mäuse keine Verhaltensänderungen und motorischen Defizite, nur eine geringe, aber normale Variabilität in ihrer täglichen Leistung.

4.2.1.2 Motorische Verhaltensanalyse

In der Charakterisierungsstudie wurde die motorische Leistung der Mäuse durch die folgenden Verhaltenstests evaluiert: dem modifizierten Stabtest, dem Greifstärketest, dem Spreizreflextest der Hinterbeine, dem Rotarod-Test und der modifizierten Ganganalyse.

Modifizierter Stabtest

Zur Evaluierung von motorischen Defiziten wurde eine modifizierte Version des Stabtests verwendet, um frühe Veränderungen in der Motorik der SOD1*G93A Mäuse zu detektieren. Anstelle mit dem Kopf nach oben, wurden die Mäuse direkt mit dem Kopf nach unten am oberen Ende einer 50 cm langen, vertikalen Stange platziert. Das Laufverhalten der Mäuse wurde, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, bewertet. Je höher der Beurteilungspunkt war, umso defizitärer war die motorische Leistung. Im Alter von 6 Wochen wiesen die transgenen SOD1*G93A Mäuse erste signifikante Defizite im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren auf (Abb. 12 a, t-Test, ntg vs. tg, Woche 6: $t(26) = -2,280$; $p = 0,031$). Dieser Trend setzte sich bis zum Versuchsende weiter fort (Abb. 12 a, t-Test, ntg vs. tg, Woche 20: $t(12) = -17,690$; $p < 0,001$).

Greifstärketest

Im Greifstärketest wurden die Mäuse mit den Vorderpfoten an ein Zugsystem geführt, an dem sich die Tiere instinktiv festhielten. Durch eine kurze und gleichmäßig starke Zugbewegung wurden die Mäuse vom System weggezogen. Die maximale Greifstärke wurde über einen Signalverstärker innerhalb des Gerätes gemessen. Ab dem Alter von vier Wochen nahm die Greifstärke beider Versuchsgruppen zu. Innerhalb von vier Wochen besaß die Gruppe der nicht-transgenen Mäuse eine um 96,3 % gesteigerte Greifstärke und die Gruppe der transgenen SOD1*G93A Mäuse steigerte die Greifstärke um 34,2 %. In der

zweiten Versuchshälfte im Alter von 12 Wochen wurde eine signifikante Beeinträchtigung in der Greifstärke zwischen den nicht-transgenen und transgenen Geschwistertieren gemessen (Abb. 12 b, t-Test, ntg vs. tg, Woche 12: $t(12) = -5,511$; $p < 0,001$). Dieser Trend setzte sich bis zum Ende der Charakterisierungsstudie fort (Abb. 12 b, t-Test, ntg vs. tg, Woche 20: $t(12) = 3,862$; $p = 0,002$).

Spreizreflextest der Hinterbeine und Evaluierung der Krankheitsprogression

Ein charakteristisches Merkmal der Krankheitsprogression im SOD1*G93A Mausmodell ist der Verlust des Spreizreflex der Hinterbeine (Mead et al., 2011, Lee et al., 2019). Beide Versuchsgruppen zeigten in den ersten Versuchswochen einen gesunden und normalen Spreizreflex der Hinterbeine. Ab dem Alter von acht Wochen zeigten sich erste Defizite in der Motorik der transgenen SOD1*G93A Mäuse, die ab diesem Zeitpunkt wöchentlich zunahmen. Im Alter von 12 Wochen war der Spreizreflex der Hinterbeine der SOD1*G93A Mäusen signifikant defizitär im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren (Abb. 12 c, t-Test, $t(12) = 2,847$; $p = 0,015$). Motorische Defizite in der Spreizung wurden bei 11 von 14 transgenen SOD1*G93A Mäusen festgestellt, bevor die Versuchsgruppen im Alter von 10 Wochen halbiert wurden. Im Spreizreflextest erhielten die transgenen SOD1*G93A Tiere im Alter von durchschnittlich 73 ± 9 Tagen das erste Mal eine Bewertung von 1 Pkt. („schwache Spreizung“ einer Hintergliedmaße, Kapitel 4.1.2).

Für das SOD1*G93A Mausmodell wurde der Zeitpunkt „Krankheitsbeginn“ nach den Kriterien von Mead et al. (2011) definiert (Kapitel 4.1.2). Als „Krankheitsbeginn“ gilt der Zeitpunkt, zu dem bei einer Maus zeitgleich ein Defizit des Spreizreflexes und ein deutlicher Tremor in den Hinterbeinen detektiert wird. Die Entwicklung eines Tremors in den Hinterbeinen der transgenen SOD1*G93A Mäusen ist während der Krankheitsprogression des Phänotyps ein weiteres motorisches Merkmal. Ein Tremor ist eine unwillkürliche, rhythmische, zitternde Bewegung eines Muskels, welcher in natürlicher Form oder in Folge einer Erkrankung durch die Überanstrengung einer Muskelgruppe ausgelöst wird. Der mittlere Krankheitsbeginn der SOD1*G93A Gruppe betrug 96 ± 14 Tage (Abb. 12 d). Die nicht-transgenen Geschwistertiere zeigten keinen Tremor während des Versuchszeitraums. Der beginnende Verlust des Spreizreflexes tritt zeitlich vor dem Einsetzen eines Tremors auf. Die statistische Analyse ergab, dass der Spreizverlust der Hinterbeine zeitlich signifikant vor dem Zeitpunkt „Krankheitsbeginn“ lag (Abb. 12 d, t-Test, $t(12) = 3,726$; $p = 0,003$).

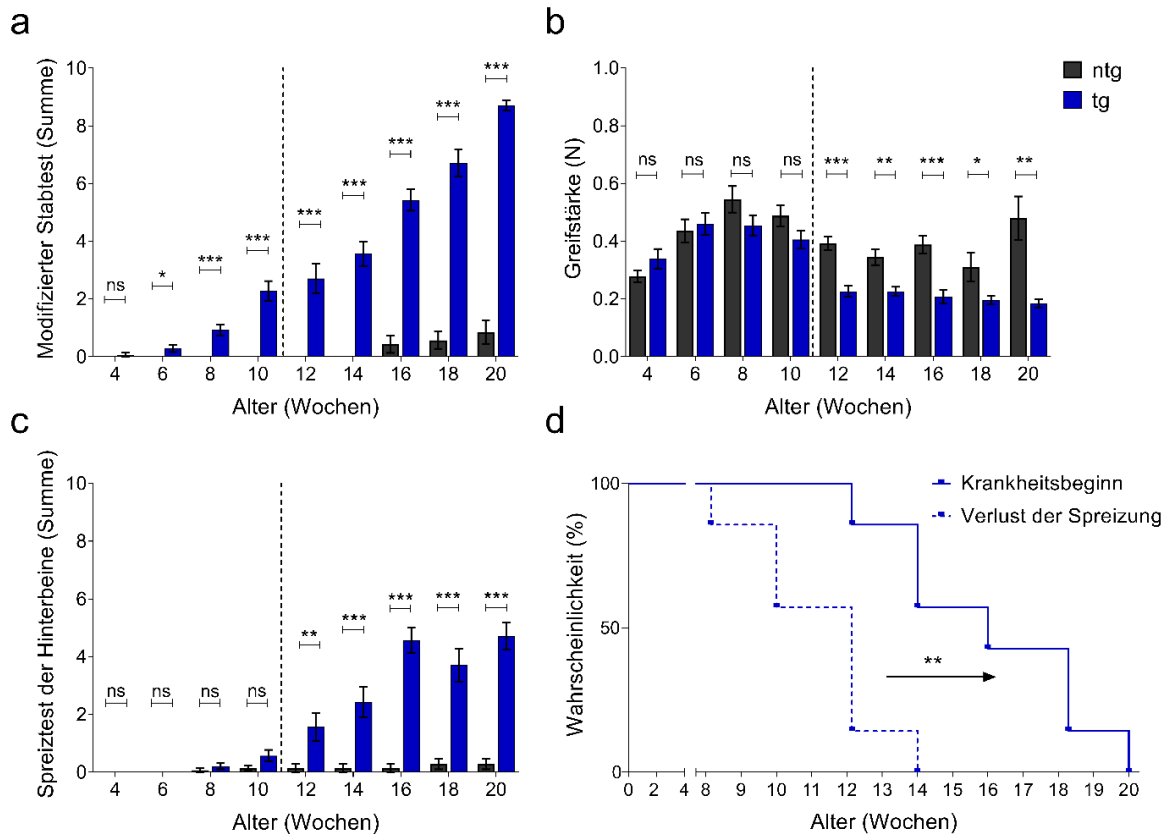


Abb. 12 Untersuchungen der motorischen Leistung von nicht-transgenen und transgenen Mäuse, sowie Bestimmung des Zeitpunkts „Krankheitsbeginn“ der transgenen SOD1*G93A Versuchsgruppe.

Die Analyse der motorischen Leistung erfolgte mit verschiedenen Tests, wie dem modifizierten Stabtest (a), dem Greifstärketest (b) oder dem Spreiztest der Hinterbeine (c). Der Zeitpunkt „Krankheitsbeginn“ wurde anhand der Definition nach *Mead et al.* (2011) mittels Wahrscheinlichkeitsanalyse nach Kaplan-Meier ermittelt (d). Die gestrichelte Linie gibt die zeitliche Veränderung der Anzahl pro Versuchsgruppen wieder (Versuchszeitpunkte 4 bis 10 Wochen: ntg und tg je n = 14 und Versuchszeitpunkte 12 bis 20 Wochen: ntg und tg je n = 7). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels t-Test durchgeführt. Sternchen (*) zeigen eine Signifikanz zwischen der nicht-transgenen und transgenen Versuchsgruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001. Ein p-Wert von $\geq$ 0,05 wurde als statistisch nicht signifikant (ns) angesehen. ntg: nicht-transgen, tg: transgen

Rotarod-Test

Die motorische Leistung der Mäuse wurde zusätzlich im Rotarod-Test untersucht. Hierbei saßen die Tiere auf einen sich beschleunigenden Zylinder und es wurde die Zeit gemessen bis die Tiere vom Zylinder herunterfielen. Die sogenannte Latenzzeit ist ein Maß zur Bewertung der motorischen Leistung und wurde zur Analyse verwendet. Dazu wurde der Mittelwert der sechs Durchgänge pro Testtag genutzt.

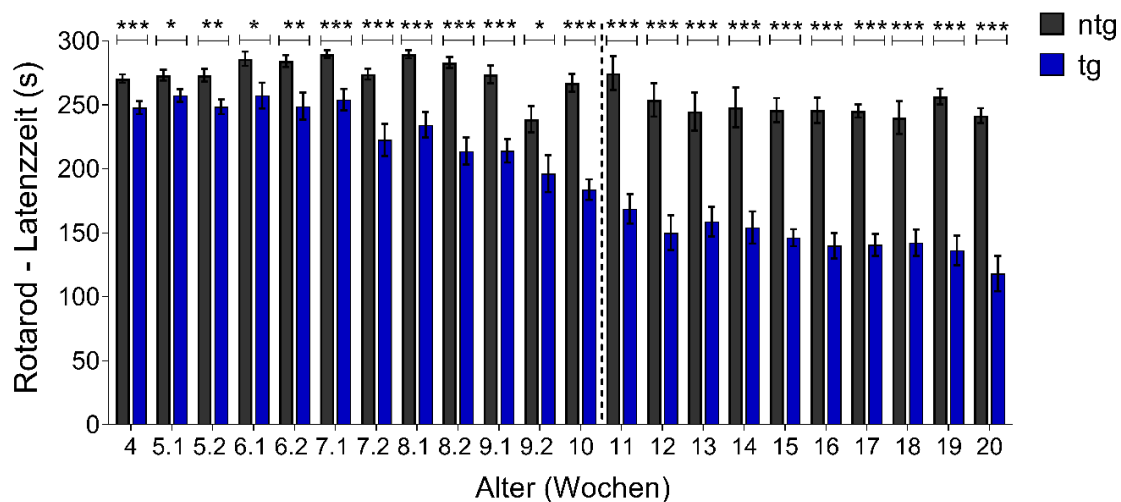


Abb. 13 Charakterisierung der motorischen Leistung von transgenen SOD1*G93A Mäusen und nicht-transgenen Geschwistertiere im Rotarod-Test.

Ab einem Alter von 4 bis 10 Wochen wurde die Motorik der transgenen und nicht-transgenen Geschwistertiere (SOD1*G93A und ntg je n = 14) wöchentlich zweimal im Rotarod-Test überprüft und nach der Halbierung der Versuchsgruppen (SOD1*G93A und ntg je n = 7) einmal pro Woche bis zum Versuchsende mit 20 Wochen. Die gestrichelte Linie gibt die zeitliche Veränderung der Anzahl pro Versuchsgruppen wieder (Versuchszeitpunkte 4 bis 10 Wochen: ntg und tg je n = 14 und Versuchszeitpunkte 11 bis 20 Wochen: ntg und tg je n = 7). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels t-Test durchgeführt. Sternchen (*) zeigen eine Signifikanz zwischen der nicht-transgenen und transgenen Versuchsgruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001. Ein p-Wert von $\geq$ 0,05 wurde als statistisch nicht signifikant (ns) angesehen. ntg: nicht-transgen, tg: transgen

Ab dem Alter von vier Wochen war eine signifikant verringerte, motorische Leistung der transgenen SOD1*G93A Mäuse sichtbar (Abb. 13, t-Test, ntg vs. tg, Woche 4: $t(26) = 3,578$; p < 0,001). Die motorische Leistung der transgenen SOD1*G93A Mäuse nahm in den ersten sechs Wochen signifikant ab (Abb. 13, gepaarter t-Test, tg Woche 4 vs. tg Woche 10: $t(13) = 6,703$; p < 0,001), während die Leistung der nicht-transgenen Geschwistertiere auf dem gleichen Level blieb (Abb. 13, gepaarter t-Test, ntg Woche 4 vs. tg Woche 10: $t(13) = 0,466$; p $\geq$ 0,05). Beide Gruppen zeigten zeitliche Schwankungen in der motorischen Leistung abhängig vom Versuchstag pro Woche im Zeitraum 4 bis 10 Wochen (erster Versuchstag vs. zweiter Versuchstag). Die Latenzzeit der transgenen Tiere betrug am ersten Versuchstag pro Woche $233 \pm 12,1$ s und am zweiten Versuchstag pro Woche $229 \pm 9,07$ s. Eine Analyse mittels gepaarten t-Test ergab keinen signifikanten Unterschied der Latenzzeit in der Versuchsgruppe der transgenen SOD1*G93A Mäuse. Die motorische Leistung der nicht-transgenen Mäuse war am ersten Versuchstag signifikant stärker im

Vergleich zum zweiten Versuchstag (gepaarten t-Test, ntg, erster Versuchstag (Latenzzeit: $279 \pm 3,94$ s) vs. zweiter Versuchstag (Latenzzeit: $270 \pm 6,76$ s): $t(83) = -3,733$; $p < 0,001$).

In der zweiten Versuchshälfte von Woche 11 bis Woche 20, nahm die motorische Leistung der verbliebenen sieben transgenen SOD1*G93A Mäuse signifikant weiter ab im Vergleich zu den verbliebenen sieben nicht-transgenen Geschwistertieren. Im Alter von 20 Wochen betrug die durchschnittliche Latenzzeit der transgenen Tiere $118 \pm 13,7$ s, während die nicht-transgenen Mäuse eine Latenzzeit von $241 \pm 5,9$ s auf dem Rotarod aufwiesen (Abb. 13, Rotarod, t-Test, ntg vs. tg, Woche 20: $t(6) = -8,265$; $p < 0,001$). Während der Dauer des gesamten Versuches reduzierte sich die motorische Leistung der transgenen SOD1*G93A vom ersten bis zum letzten Versuchstag um 52,3 %. Dem gegenüber nahm die Leistung der nicht-transgenen Geschwistertieren um 10,7 % ab, welches auf das motorische Lernverhalten der Mäuse zurückzuführen ist.

Ganganalyse

Die Ganganalyse wurde zur weiteren Untersuchung des Phänotyps der transgenen SOD1*G93A Mauslinie durchgeführt. Die folgenden Parameter wurden analysiert: die Schrittlänge, die Zwischenschrittlänge, die Gangbasis und die Schritttanzahl (Kapitel 4.1.2). Die Ganganalyse der Vorder- bzw. Hinterpfoten der linken und rechten Körperseite ergab keinen Unterschied in den untersuchten Parametern. Daher sind folgend nur die Ergebnisse aus der Analyse der Hinterpfoten aufgeführt.

Die Schrittlänge der beiden Versuchsgruppen war bis zu einem Alter von 14 Wochen gleich dem Wildtypniveau (Mittelwert der Schrittlänge von Woche 4 bis 14: ntg = $5,17$ cm vs. tg = $4,99$ cm). Ab dem Alter von 16 Wochen reduzierte sich die Schrittlänge der transgenen SOD1*G93A Mäuse signifikant gegenüber der Schrittlänge der nicht-transgenen Geschwistertiere (Woche 16: ntg = $5,91 \pm 0,28$ cm vs. tg = $5,23 \pm 0,16$ cm; Woche 18: ntg = $6,43 \pm 0,23$ cm vs. tg = $5,59 \pm 0,30$ cm und Woche 20: ntg = $6,33 \pm 0,21$ cm vs. tg = $5,21 \pm 0,23$ cm). In der 16. Woche und am letzten Versuchstag wurde eine signifikante Verkürzung der Schrittlänge von transgenen SOD1*G93A Mäusen im Vergleich zur Schrittlänge der nicht-transgenen Gruppe beobachtet (Abb. 14 a, t-Test, Woche 16: $t(12) = -2,503$; $p = 0,028$ und Woche 20: $t(12) = 4,195$; $p < 0,001$).

Zusätzlich zur Schrittlänge, wurde mithilfe der Ganganalyse die Zwischenschrittlänge analysiert, d.h. der diagonale Abstand der linken und rechten Pfotenabdrücke. Im ersten Versuchszeitraum stieg die Zwischenschrittlänge signifikant innerhalb der nicht-transgenen Versuchsgruppe (Abb. 14 b, gepaarter t-Test, $t(13) = -13,347$; $p < 0,001$, ntg: Woche 4 = $2,61 \pm 0,08$ cm vs. Woche 10 = $3,87 \pm 0,08$ cm), als auch innerhalb den transgenen

Versuchsgruppe an (Abb. 14 b, gepaarter t-Test, $t(13) = - 8,315$; $p < 0,001$, tg: Woche 4 = $2,60 \pm 0,09$ cm vs. Woche 10 = $3,72 \pm 0,08$ cm). Bis zum Alter von 14 Wochen gab es keinen signifikanten Unterschied in der Zwischenschrittlänge der nicht-transgenen und der transgenen Versuchsgruppe. Die nicht-transgenen Tiere zeigten einen kontinuierlichen Anstieg der Zwischenschrittlänge bis zum Versuchsende, während die transgenen SOD1*G93A Mäuse ab einem Alter von 16 Wochen bis zum Versuchsende eine signifikante Abnahme der Zwischenschrittlänge aufwiesen (Abb. 14 b, t-Test, $t(12) = 2,436$; $p < 0,001$, ntg vs. tg, Woche 16).

Mit der Gangbasis wurde der mittlere Abstand der parallel zueinander gelaufenen linken und rechten Pfotenabdrücke analysiert, d.h. Abstand zwischen der linken zur rechten Vorderpfote bzw. der linken zur rechten Hinterpfote. In der ersten Versuchshälfte vergrößerte sich die Gangbasis der nicht-transgenen Versuchsgruppen signifikant (Abb. 14 c, gepaarter t-Test, $t(13) = - 4,838$; $p < 0,001$, ntg: Woche 4 = $1,96 \pm 0,11$ cm vs. Woche 10 = $2,70 \pm 0,11$ cm), sowie die Gangbasis der transgenen SOD1*G93A Mäuse Versuchsgruppen (Abb. 14 c, gepaarter t-Test, $t(13) = - 5,946$; $p < 0,001$, tg: Woche 4 = $1,81 \pm 0,04$ cm vs. Woche 10 = $2,45 \pm 0,09$ cm). Die Analyse der Gangbasis ergab keine signifikante Änderung vom Laufverhalten der transgenen vs. nicht-transgenen Versuchsgruppe während der gesamten Versuchszeit.

Weiterführend ließ sich in der Ganganalyse die Anzahl der pro Maus gelaufenen Schritte untersuchen. In der ersten Versuchswoche, d.h. im Alter von vier Wochen, war die benötigte Schrittzahl in beiden Versuchsgruppen am höchsten. Die Anzahl der Schritte der nicht-transgenen Versuchsgruppe betrug im Mittel 10 Schritte und 10,2 Schritte in der transgenen SOD1*G93A Versuchsgruppe. Mit dem Heranwachsen der Jungtiere zu adulten Mäusen reduzierte sich die durchschnittliche Schrittzahl pro Versuchsgruppe im Alter von 10 Wochen auf 7,3 Schritte (ntg) bzw. 7,6 Schritte (tg). Es gab in den ersten Versuchswochen eine signifikante Abnahme der Zwischenschrittlänge innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe, nicht aber zwischen den beiden Versuchsgruppen (Abb. 14 d, t-Test, ntg vs. tg, Woche 4 bis Woche 14; $p \geq 0,05$). Erst im Alter von 16 Wochen benötigten transgene SOD1*G93A Mäuse signifikant mehr Schritte für die zurückzulegende Strecke im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren (Abb. 14 d, t-Test, $t(12) = - 2,782$; $p = 0,017$). Der signifikante Trend setzte sich bis zum Versuchsende fort. Im Alter von 20 Wochen brauchten die transgenen SOD1*G93A Mäuse durchschnittlich 7,9 Schritte zum zurückzulegen der vorgegebenen Strecke, während die nicht-transgenen Geschwistertiere 6,4 Schritte benötigten. Damit lag die Schrittzahl der transgenen Versuchsgruppe signifikant höher im Vergleich zur nicht-transgenen Versuchsgruppe (Abb. 14 d, t-Test, $t(12) = - 4,330$; $p < 0,001$).

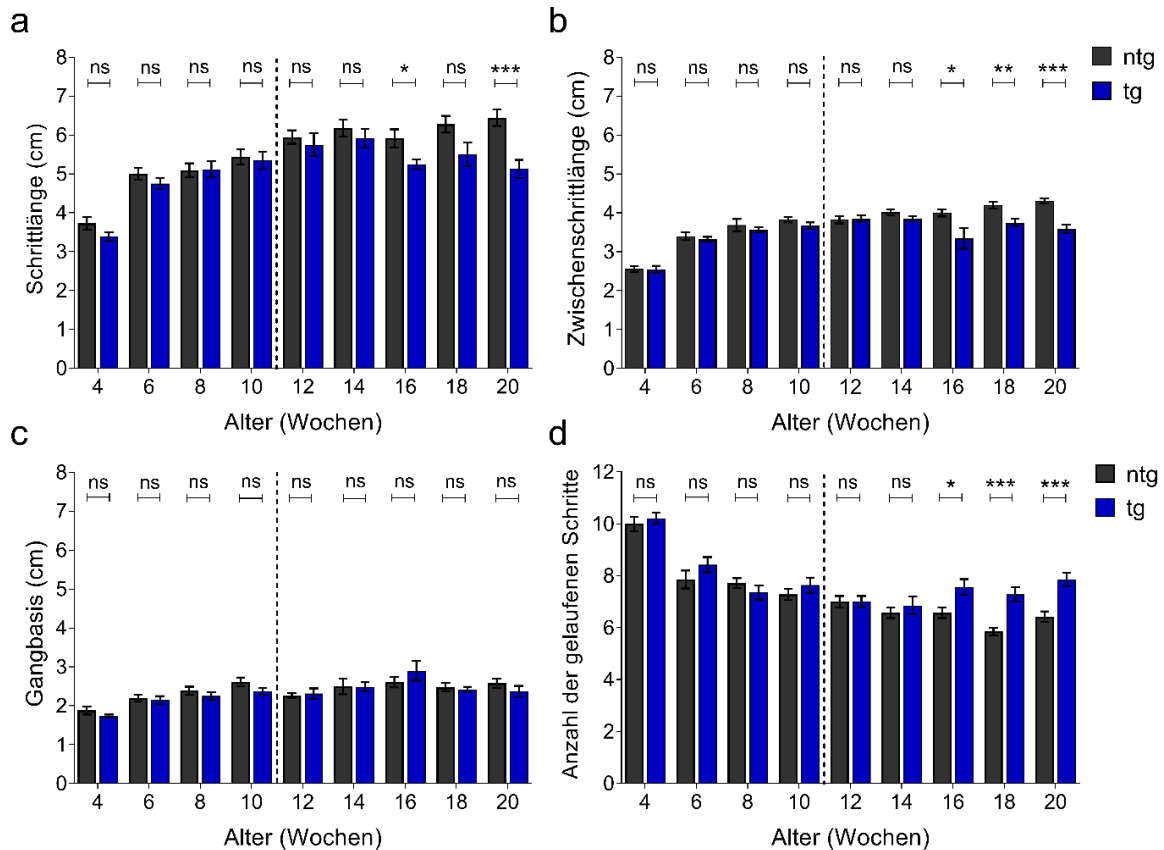


Abb. 14 Untersuchungen der Gangart im Fußabdrucktest.

Ab einem Alter von 4 Wochen wurden die Gangart von transgenen SOD1*G93A Mäusen und nicht-transgenen Geschwistertieren in regelmäßigen Abständen bis zu einem Alter von 20 Wochen untersucht. Die Ganganalyse erfolgte anhand der Parameter: Schrittlänge (a), Zwischenschrittlänge (b), Gangbasis (c) und Schrittzahl (d). Die gestrichelte Linie gibt die zeitliche Veränderung der Anzahl pro Versuchsgruppen wieder (Versuchszeitpunkte 4 bis 10 Wochen: ntg und tg je n = 14 und Versuchszeitpunkte 12 bis 20 Wochen: ntg und tg je n = 7). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels t-Test durchgeführt. Sternchen (*) zeigen eine Signifikanz zwischen der nicht-transgenen und transgenen Versuchsgruppe; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$. Ein p-Wert von $\geq 0,05$ wurde als statistisch nicht signifikant (ns) angesehen. ntg: nicht-transgen, tg: transgen

Zusammengefasst zeigten die transgenen SOD1*G93A Mäuse im Versuchsverlauf ab einem Alter von 16 Woche eine veränderte Gangart im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren.

4.2.1.3 Analyse des *M. gastrocnemius*

Für die weitere phänotypische Charakterisierung des Krankheitsverlaufes der SOD1*G93A Mäuse wurde das Volumen und Gewicht des *M. gastrocnemius* untersucht (Abb. 15 und Abb. 16).

Hierfür wurde im Alter von 10 Wochen eine MRT-Messung vom rechten *M. gastrocnemius* aller 28 Versuchstiere durchgeführt wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben. Für die Berechnung des Muskelvolumens (cm^3) wurde die zu analysierende Fläche des Muskels freihändig eingekreist, um das Wadenbein, die Gewebeschichten und das Fett von der Analyse auszuschließen. Aufgrund eines Betriebsausfall des MRT zu einem späteren Zeitpunkt, konnte nur die geplante Messung im Alter von 10 Wochen durchgeführt werden. Das Volumen (cm^3) des Zwillingswadenmuskels der transgenen SOD1*G93A Mäuse war signifikant reduziert im Vergleich zum Muskelvolumen (cm^3) der nicht-transgenen Geschwistertiere (Abb. 15 a, ntg $0,016 \pm 0,001 \text{ cm}^3$ und tg $0,012 \pm 0,001 \text{ cm}^3$, t-Test, $t(26) = 6,096$; $p < 0,001$). Auch das Volumen des *M. gastrocnemius* pro g Körpergewicht wurde analysiert. Hierbei ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Muskelvolumen pro Körpergewicht (cm^3/g) zwischen den nicht-transgenen und transgenen Geschwistertieren (Abb. 15 b, t-Test, $t(12) = 3,240$; $p = 0,007$).

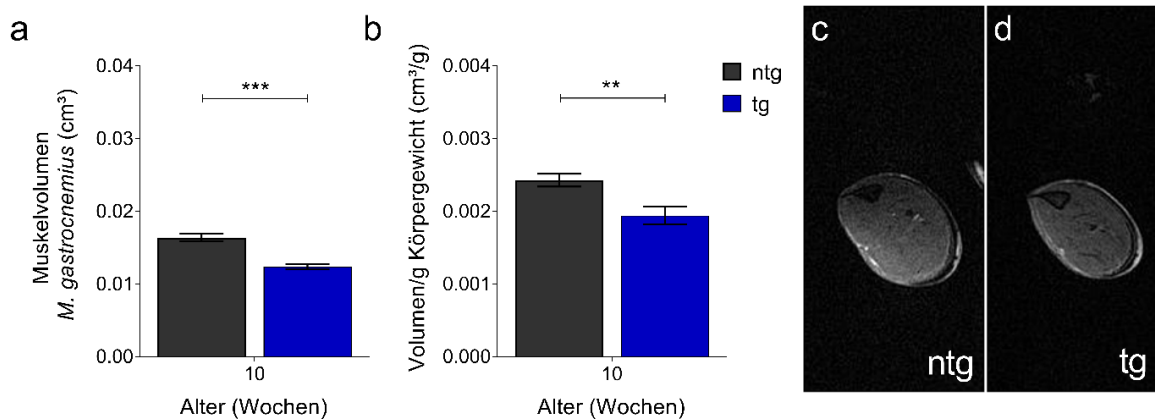


Abb. 15 T1-gewichtetet MRT-Messung des *M. gastrocnemius* im Alter von 10 Wochen.

Das Muskelvolumen des *M. gastrocnemius* wurde mit Hilfe einer MRT-Messung evaluiert (a) und in Relation zum Körpergewicht gesetzt (b). In den Abbildungen c und d sind exemplarisch die MRT-Aufnahmen des *M. gastrocnemius* einer nicht-transgenen und transgenen Maus im Alter von 10 Wochen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels t-Test durchgeführt. Sternchen (*) zeigen eine Signifikanz zwischen der nicht-transgenen und transgenen Versuchsgruppe; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$. ntg: nicht-transgen, tg: transgen

Zusätzlich zur Bestimmung des Muskelvolumens wurde das Gewicht des *M. gastrocnemius* untersucht. Zu diesem Zweck wurden wie im Kapitel 4.1.2 beschrieben 7 Tieren pro Versuchsgruppe nach der MRT-Messung aus dem Versuch genommen. Von den verbliebenen 14 Tieren wurde der *M. gastrocnemius* nach Versuchsende entnommen und gewogen. Mit 10 Wochen betrug das Gewicht des *M. gastrocnemius* der transgenen SOD1*G93A Mäuse $0,08 \pm 0,002 \text{ g}$ im Vergleich zur nicht-transgenen Versuchsgruppe mit einem Gewicht von $0,11 \pm 0,001 \text{ g}$. Das Muskelgewicht der transgenen SOD1*G93A

Mäusen war signifikant reduziert (Abb. 16 a, t-Test, $t(12) = 12,512$; $p < 0,001$). Die Gewichtsanalyse aus der Gewebeentnahme stützte das Ergebnis der MRT-Daten.

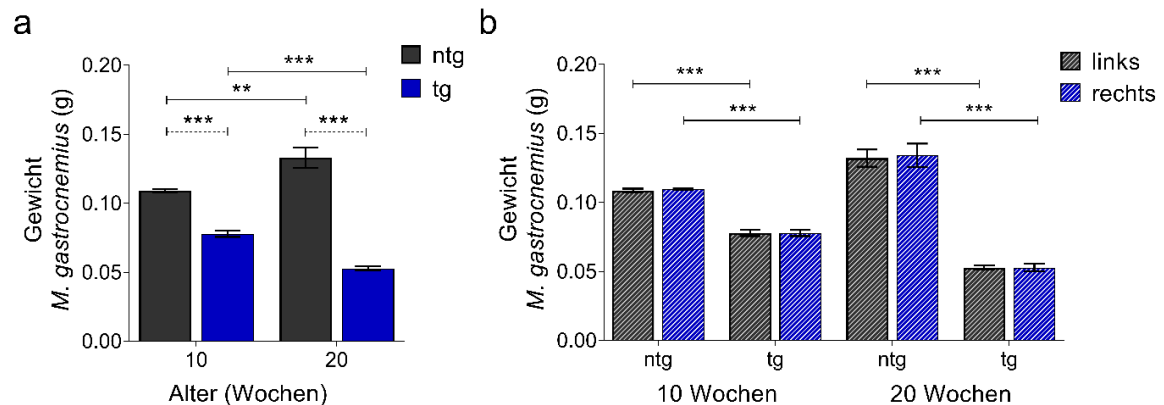


Abb. 16 Gewichtsanalyse des *M. gastrocnemius* im Krankheitsverlauf.

Dargestellt ist das Gewicht vom *M. gastrocnemius* von je 7 nicht-transgenen und transgenen Versuchstiere nach der Präparation im Alter von 10 und 20 Wochen (a) und differenziert in den linken und rechten Muskel zum jeweiligen Versuchszeitpunkt (b). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels t-Test durchgeführt. Sternchen (*) zeigen eine Signifikanz zwischen der nicht-transgenen und transgenen Versuchsgruppe; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$. ntg: nicht-transgen, tg: transgen

Im Verlauf der nächsten 10 Wochen kam es zum weiteren Abbau vom Muskelgewebe. Im Alter von 20 Wochen betrug das Gewicht vom *M. gastrocnemius* der transgenen SOD1*G93A Mäuse mit $0,05 \pm 0,001$ g signifikant weniger als das Gewicht der Muskeln der gleichaltrigen nicht-transgenen Geschwistertiere mit $0,13 \pm 0,01$ g (Abb. 16 a, t-Test, $t(12) = 10,759$; $p < 0,001$). Weiterhin veränderte sich das Gewicht des *M. gastrocnemius* innerhalb der Versuchsgruppen zwischen der ersten und zweiten Muskelentnahme signifikant (Abb. 16 a, Woche 10 vs. Woche 20). Während die nicht-transgene Gruppe das Gewicht vom *M. gastrocnemius* signifikant steigerte, reduzierte sich das Gewicht vom *M. gastrocnemius* der transgenen SOD1*G93A Mäuse signifikant (Abb. 16 a, ntg: t-Test, $t(12) = -3,254$; $p = 0,007$ und tg: t-Test, $t(12) = 9,113$; $p < 0,001$). Eine separate Analyse der Gewichte vom linken und rechten *M. gastrocnemius* zu beiden Zeitpunkte zwischen den zwei Versuchsgruppen spiegelte die vorher ermittelten Signifikanzen wider (Abb. 16 b, ntg vs. tg, 10 Wochen; links: t-Test, $t(12) = 11,159$; $p < 0,001$ und rechts: t-Test, $t(12) = 13,633$; $p < 0,001$; 20 Wochen; links: t-Test, $t(12) = 12,339$; $p < 0,001$ und rechts: t-Test, $t(12) = 9,126$; $p < 0,001$).

4.2.2 Kurative Therapiestudie

In den Abbildungen der kurativen Therapiestudie sind die statistisch analysierten Daten von Placebo-behandelt, nicht-transgenen vs. Placebo-behandelt, transgenen Mäusen, L-RD2RD2-behandelt, nicht-transgenen vs. L-RD2RD2-behandelt, transgenen Mäusen und Placebo-behandelt, transgenen vs. L-RD2RD2-behandelt, transgenen Mäusen dargestellt.

4.2.2.1 Primäre Verhaltensanalyse

Offenfeldtest

Der Offenfeldtest wurde verwendet, um die Auswirkungen von L-RD2RD2 auf das Explorationsverhalten und die Bewegungsaktivität sowohl bei transgenen als auch bei nicht-transgenen Mäusen zu bewerten (Abb. 17). Zum Zeitpunkt Basismessung (Behandlungswoche 0) waren die jeweiligen Versuchsgruppen wie im Kapitel 4.1.2 beschrieben nicht stratifiziert. In der Behandlungswoche 0, d.h. vor Behandlungsbeginn mit L-RD2RD2, liefen die den Behandlungsgruppen ntg L-RD2RD2 und L-RD2RD2 zugeordneten nicht-transgenen und transgenen Mäuse mehr und mit einer erhöhten Laufgeschwindigkeit in der Arena umher im Vergleich zu den nicht-transgenen und transgenen Mäusen, die der Placebo Behandlungsgruppe (ntg und Placebo) zugeordnet waren. Die L-RD2RD2-behandelte, transgene Gruppe lief signifikant schneller in der Arena umher und legte in Behandlungswoche 0 eine weitere Distanz zurück als die Placebo-behandelten, transgenen Geschwistertiere (Abb. 17 a und c, Behandlungswoche 0, einfaktorielle ANOVA, Laufgeschwindigkeit: $f(3,40) = 2,685$; $p = 0,059$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, Placebo vs. L-RD2RD2 $p = 0,050$ und Distanz: $f(3,40) = 2,822$; $p = 0,051$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, Placebo vs. L-RD2RD2 $p = 0,046$). In der zweiten Testung zeigte sich, dass alle Versuchsgruppen im Verlauf der Zeit signifikant reduzierter in der Testarena umher liefen, mit Ausnahme der nicht-behandelten, nicht-transgenen Mäuse (Abb. 17 b und d). Sowohl die Laufgeschwindigkeit, als auch die zurückgelegte Distanz waren im Vergleich zur Basismessung (Behandlungswoche 0) der zweiten Messung (Behandlungswoche 10) bei den L-RD2RD2-behandelten, nicht-transgenen und transgenen Mäusen, sowie den Placebo-behandelten SOD1*G93A Geschwistertieren signifikant reduziert (Abb. 17 b und d, gepaarter t-Test, Laufgeschwindigkeit: ntg t-Test, $t(8) = 1,348$; $p = 0,220$ (ns); ntg L-RD2RD2 t-Test, $t(8) = 4,504$; $p = 0,003$; Placebo t-Test, $t(14) = 3,649$; $p = 0,003$ und L-RD2RD2 t-Test, $t(14) = 4,718$; $p < 0,001$; Distanz: ntg t-Test, $t(8) = 1,288$; $p = 0,239$ (ns); ntg L-RD2RD2 t-Test, $t(8) = 4,515$; $p = 0,003$; Placebo t-Test, $t(14) = 3,507$; $p = 0,004$ und L-RD2RD2 t-Test, $t(14) = 4,512$; $p < 0,001$). Die Laufaktivität der Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse hat bis zur 10. Behandlungswoche

soweit abgenommen, dass die Laufgeschwindigkeit und die gelaufene Distanz im Vergleich zur Placebo-behandelten, nicht-transgenen Kontrollgruppe signifikant reduziert waren (Abb. 17 a und c, Behandlungswoche 10, einfaktorielle ANOVA, Laufgeschwindigkeit: $f(3,40) = 3,592$; $p = 0,022$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, ntg vs. Placebo $p = 0,003$ und Distanz: $f(3,40) = 3,511$; $p = 0,024$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, ntg vs. Placebo $p = 0,003$).

L-RD2RD2 hat bei den behandelten, nicht-transgenen Mäusen und den behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen im Vergleich zu ihren Placebo-behandelten, transgenen Geschwistertieren keinen signifikanten Einfluss auf die motorische Aktivität oder das spontane Explorationsverhalten.

Allerdings waren die mit Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren im Offenfeldtest weniger aktiv (Abb. 17). Zu Beginn der Studie verbrachten Placebo-behandelte SOD1*G93A Mäuse im Vergleich zu nicht-transgenen Geschwistertieren signifikant mehr Zeit im Randbereich und weniger im Zentrum der Arena, was auf eine erhöhte Ängstlichkeit und ein vermindertes Erkundungsverhalten hinweist (Abb. 17 e, einfaktorielle ANOVA, Zentrum: $f(3,40) = 2,592$; $p = 0,066$ (ns), Fisher's LSD Post-hoc Analyse, ntg vs. Placebo SOD1*G93A $p = 0,014$ und Randbereich Zentrum: $f(3,40) = 2,615$; $p = 0,064$ (ns), Fisher's LSD Post-hoc Analyse, ntg vs. Placebo SOD1*G93A $p = 0,012$). Nach 10 Wochen Behandlung verschwand dieser Unterschied jedoch.

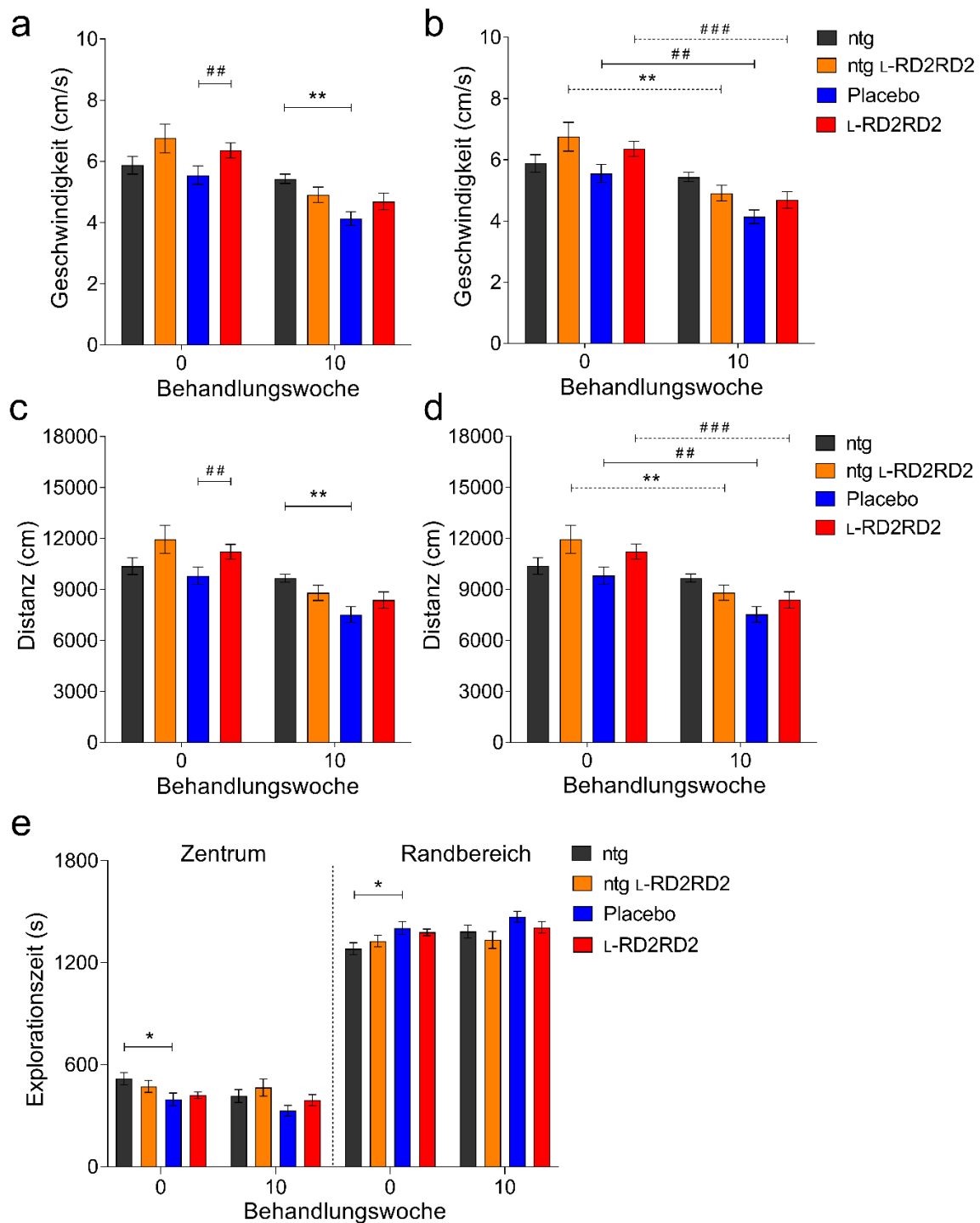


Abb. 17 Analyse des Erkundungsverhaltens und der Bewegungsaktivität aller L-RD2RD2-behandelten Mäuse und Placebo-behandelter Geschwistertiere im Offenfeldtest.

Im Offenfeldtest wurde die Bewegungsaktivität der Tiere durch die Laufgeschwindigkeit (a und b) und zurückgelegte Strecke (c und d), sowie das explorative Verhalten (e) zum Zeitpunkt vor und 10 Wochen nach Behandlungsbeginn evaluiert. Die Placebo-behandelten SOD1^{G93A} Mäuse wiesen im Vergleich zu den nicht-behandelten, nicht-transgenen Geschwistertieren eine signifikant geringere Bewegungsaktivität nach 10 Wochen Behandlung auf (a bis e). Die Behandlung mit L-RD2RD2 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die motorische Aktivität oder das spontane

Explorationsverhalten behandelter Tiere. Die statistischen Berechnungen wurden mittels einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Fisher's LSD Post-hoc Analyse durchgeführt. Die Sternchen (*) und die Rauten (#) weisen auf eine Signifikanz zwischen den Behandlungsgruppen hin (ntg vs. tg SOD1*G93A: * $p = 0,05$, ** $p = 0,001$, *** $p < 0,001$ und Placebo vs. L-RD2RD2: # $p = 0,05$, ## $p = 0,01$, ### $p < 0,001$). ntg: nicht-transgen, tg: transgen

Analyse des Körpergewichts

Das Körpergewicht der vier Versuchsgruppen wurde über die gesamte Behandlungsdauer gemessen (Kapitel 4.1.2). Während der Behandlung gab es einen signifikanten Unterschied im absoluten Körpergewicht (g) der transgenen vs. nicht-transgenen Versuchsgruppen und zwischen den Placebo- und L-RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen (Abb. 18 a, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(3,505) = 72,82$; $p < 0,001$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, ntg vs. Placebo $p < 0,001$, ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 $p < 0,001$ und Placebo vs. L-RD2RD2 $p = 0,028$). Das relative Körpergewicht (%), d.h. die prozentuale Zu- oder Abnahme über die Behandlungsdauer bezogen auf das Körpergewicht zu Beginn der Behandlung der Mäuse, unterschied sich signifikant zwischen den transgenen und nicht-transgenen Kontrollgruppen, nicht aber zwischen den Placebo- und L-RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen (Abb. 18 b, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(3,505) = 35,294$; $p < 0,001$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, ntg vs. Placebo $p < 0,001$, ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 $p < 0,001$). Beide transgene Gruppen erreichten ihr Gewichtsmaximum in der achten Behandlungswoche (Abb. 18 a und b). Danach stagnierte das Körpergewicht der transgenen SOD1*G93A Mäuse oder das Gewicht der Tiere nahm ab (Abb. 18 a, Placebo: Woche sechs bis acht = 19,5 g, Woche neun = 19,2 g; L-RD2RD2: Woche acht = 18,7 g, Woche neun = 18,5 g, Woche zehn = 18,1 g). Zum Ende der 10. Behandlungswoche erreichten die ersten Tiere der transgenen Gruppen die Abbruchkriterien (markiert als gepunktete Linien in Abb. 18 a und b). Zwischen den L-RD2RD2-behandelten und nicht-behandelten, nicht-transgenen Mäusen (ntg L-RD2RD2 vs. ntg) gab es keinen Gewichtsunterschied während der Behandlung. Alle nicht-transgenen Mäuse nahmen ohne Unterschied zwischen L-RD2RD2-Behandlung oder Placebo konsistent an Gewicht zu (Abb. 18 a und b).

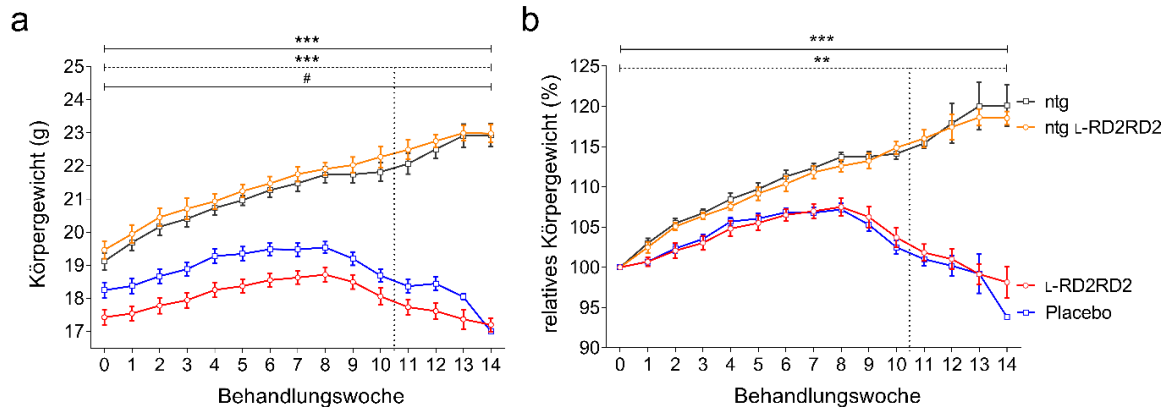


Abb. 18 Das Körpergewicht im Verlauf der Therapiestudie.

Ab Beginn der Therapiestudie wurde das Körpergewicht drei Mal pro Woche bzw. nach Scoresheet beurteilt, bis die letzte transgene Maus die Abbruchkriterien erreicht und der Versuch in der 14. Behandlungswoche beendet wurde. Die gepunktete Linie gibt den Zeitpunkt an, zudem das erste transgene Tier die Abbruchkriterien erreichte und getötet wurde. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Die statistischen Berechnungen wurden mittels zweifaktorieller wiederholter ANOVA mit anschließendem Fisher's LSD Post-hoc durchgeführt. Die Sternchen (*) und die Rauten (#) weisen auf eine Signifikanz zwischen den Behandlungsgruppen hin (ntg vs. tg SOD1*G93A: ** $p = 0,001$, *** $p < 0,001$ und Placebo vs. L-RD2RD2: # $p = 0,05$). ntg: nicht-transgen, tg: transgen

SHIRPA-Test

Zu der primären Verhaltensanalyse gehört die SHIRPA-Testbatterie. Die SHIRPA-Testbatterie wurde zur Überwachung der Progression des neurodegenerativen Phänotyps von transgenen Placebo- oder L-RD2RD2-behandelten Mäusen verwendet. Drei Wochen nach Behandlungsbeginn wurde der erste signifikant erhöhte Score von Placebo-behandelten SOD1*G93A Mäusen im Vergleich zu Placebo-behandelten, nicht-transgenen Geschwistertieren gemessen (Abb. 19 a, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(3,400) = 109,96$; $p < 0,001$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, Behandlungswoche 3: ntg vs. Placebo $p = 0,030$). Die L-RD2RD2-Behandlung verzögerte das Fortschreiten des Phänotyps transgener SOD1*G93A Mäuse im Vergleich zu Placebo-behandelten SOD1*G93A Geschwistertieren (Abb. 19 a, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(1,260) = 38,87$; $p < 0,001$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, Behandlungswoche 4: Placebo vs. L-RD2RD2 $p = 0,032$). Vier Wochen nach Behandlungsbeginn waren erstmals signifikante Unterschiede phänotypischer Charakteristika zwischen den L-RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen vs. den L-RD2RD2-behandelten, nicht-transgenen Geschwistertieren nachweisbar (Abb. 19 a, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(3,400) = 109,96$; $p < 0,001$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, Behandlungswoche 4: ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 $p = 0,024$). Die Aufteilung der Untertests in die Parameter Verhalten und Motorik spiegelte diese Tendenzen wieder (Abb. 19 b und c). Die motorischen Defizite

wurden zeitlich vor den Verhaltensänderungen der transgenen SOD1*G93A Mäuse detektiert, verglichen mit den nicht-transgenen Geschwistertieren (Abb. 19 b vs. c, Verhaltensparameter vs. motorische Parameter: ntg vs. Placebo = Behandlungswoche 4 vs. Behandlungswoche 3 und ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 = Behandlungswoche 8 vs. Behandlungswoche 4). Beide nicht-transgenen Gruppen zeigten während des gesamten Versuchszeitraums ein normales Verhalten.

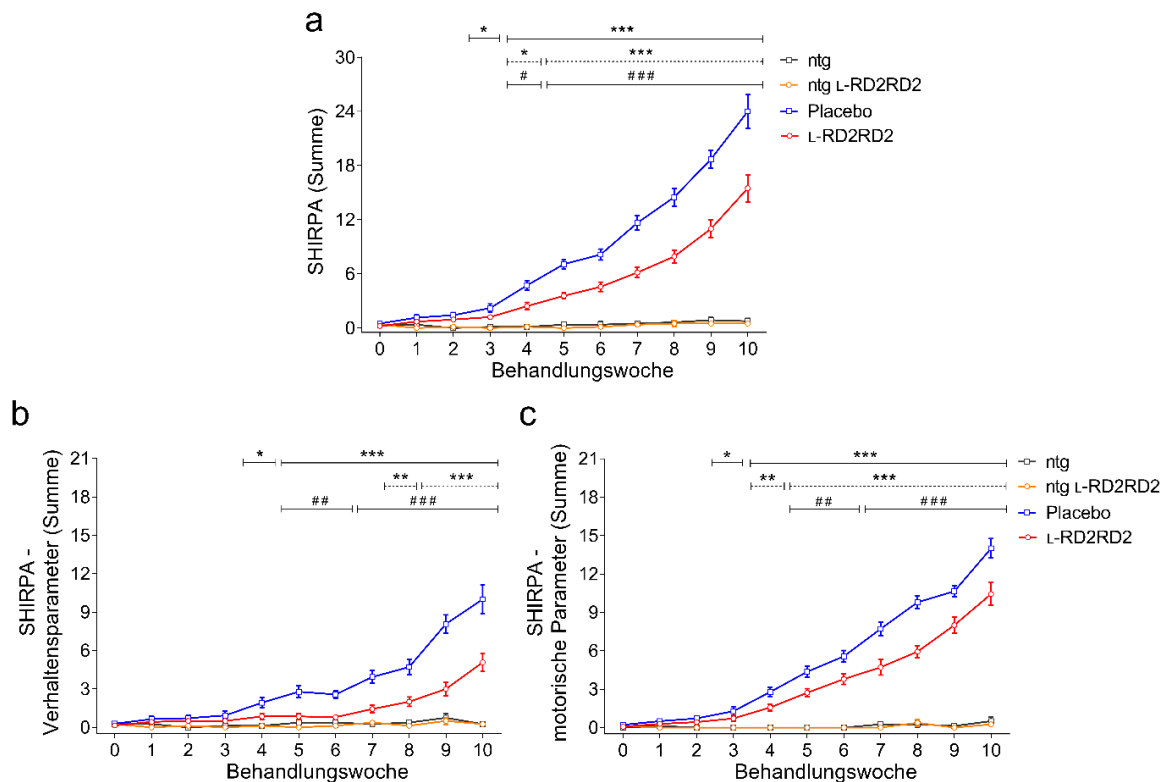


Abb. 19 Untersuchung des Allgemeinzustandes nach L-RD2RD2- oder Placebo-Gabe bei SOD1*G93A Mäusen und nicht-transgenen Geschwistertieren im SHIRPA-Test.

Die Evaluation der Daten aus der SHIRPA-Testbatterie zeigte eine signifikant gesteigerte Entwicklung des neurodegenerativen Phänotyps Placebo-behandelter SOD1*G93A Mäuse gegenüber den nicht-transgenen und L-RD2RD2-behandelten, transgenen Geschwistertieren, sowie die Verzögerung des neurodegenerativen Phänotyps von L-RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Die statistischen Berechnungen wurden mittels zweifaktorieller wiederholter ANOVA mit anschließendem Fisher's LSD Post-hoc (a) durchgeführt. Die Sternchen (*) und die Rauten (#) weisen auf eine Signifikanz zwischen den Behandlungsgruppen hin (ntg vs. tg SOD1*G93A: * $p = 0,05$, *** $p < 0,001$ und Placebo vs. L-RD2RD2: # $p = 0,05$, ### $p < 0,001$). ntg: nicht-transgen, tg: transgen

Die orale Behandlung mit L-RD2RD2 führte zu einer Stagnation des Phänotyps von transgenen SOD1*G93A Mäusen und hatte keinen Einfluss auf das Verhalten von nicht-transgenen Geschwistertieren.

4.2.2.2 Motorische Verhaltensanalyse

In den motorischen Tests wurde in regelmäßigen Abständen die Motorik der L-RD2RD2-behandelten und nicht-behandelten, nicht-transgenen und transgenen Mäuse evaluiert. Hierfür wurden die nicht-transgenen und transgenen Tiere wöchentlich im modifizierten Stabtest (Abb. 20 a), Greifstärketest (Abb. 20 b) und Spreizreflextest der Hinterbeine (Abb. 20 c), sowie jede zweite Woche im Rotarod-Test untersucht (Abb. 20 d).

Modifizierter Stabtest

Die L-RD2RD2- und Placebo-behandelten, nicht-transgenen Mäuse (ntg L-RD2RD2 und ntg) zeigten während der gesamten Versuchsdauer zu keinem Zeitpunkt Anzeichen motorischer Defizite (Abb. 20 a bis d). Die Behandlung mit L-RD2RD2 führte zu einer signifikanten Verzögerung motorischer Defizite und zu einer stabileren motorischen Leistung im modifizierten Stabtest in transgenen SOD1*G93A Mäusen vs. Placebo-behandelten, transgenen Geschwistertieren (Abb. 20 a, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(1,260) = 29,15$; $p < 0,001$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, Placebo vs. L-RD2RD2 $p < 0,001$). Trotz dieser Verzögerung wiesen die beiden transgenen Versuchsgruppen im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren ab der zweiten Behandlungswoche signifikante Leistungsdefizite der Motorik im modifizierten Stabtest auf (Abb. 20 a, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(3,400) = 141,55$; $p < 0,001$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, Behandlungswoche 2: ntg vs. Placebo $p = 0,004$ und ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 $p = 0,032$).

Greifstärketest

Im Gegensatz zur Charakterisierungsstudie wurde in allen Therapiestudien ein Greifgitter verwendet, das einzig zur Messung der Greifstärke der Hinterbeine ausgelegt war (Kapitel 4.1.2). Von Beginn der Therapiestudie an wiesen alle transgenen SOD1*G93A Mäuse im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren bereits signifikante Defizite in der Greifstärke der Hinterbeine auf (Abb. 20 b, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(3,400) = 147,01$; $p < 0,001$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, Behandlungswoche 0: ntg vs. Placebo $p = 0,006$ und ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 $p = 0,003$). Ab der zweiten Behandlungswoche war die Greifstärke der Hinterbeine L-RD2RD2-behandelter, transgener SOD1*G93A Mäuse signifikant stärker im Vergleich zu Placebo-behandelten, transgenen Mäusen (Abb. 20 b, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(1,260) = 38,58$; $p < 0,001$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, Behandlungswoche 2: Placebo vs. L-RD2RD2 $p = 0,027$). Die Greifstärke der Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse nahm ab der fünften Behandlungswoche kontinuierlich bis zum Versuchende ab (Abb. 20 b). Die Behandlung

mit L-RD2RD2 in den transgenen Geschwistertieren verzögerte die Abnahme der Greifstärke bis in die siebte Behandlungswoche, jedoch verringerte sich die motorische Leistung ab diesem Zeitpunkt kontinuierlich und analog der Leistung Placebo-behandelter, transgener SOD1*G93A Geschwistertiere (Abb. 20 b).

Spreizreflextest der Hinterbeine

Wie in den vorherigen Studien wurden die Tiere während der kurativen Therapie auf einen gesunden und normalen Spreizreflex der Hinterbeine untersucht. Die L-RD2RD2- und Placebo-behandelten, nicht-transgenen Mäuse zeigten über die gesamte Versuchsdauer einen gesunden und normalen Spreizreflex der Hinterbeine im Vergleich zu den transgenen Geschwistertieren (Abb. 20 c, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(3,400) = 259,61$; $p < 0,001$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse ntg vs. Placebo $p < 0,001$ und ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 $p < 0,001$). Ab der dritten Behandlungswoche war der Spreizreflex in den Hinterbeinen von Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen signifikant defizitär im Vergleich zur L-RD2RD2-behandelten, transgenen Versuchsgruppe (Abb. 20 c, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(1,260) = 41,31$; $p < 0,001$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, Behandlungswoche 3: Placebo vs. L-RD2RD2 $p = 0,025$). Bis zum Ende der Versuchsdauer war das Fortschreiten des motorischen Verlustes des Spreizreflexes in L-RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen signifikant verlangsamt im Vergleich zu Placebo-behandelten, transgenen Geschwistertieren (Abb. 20 c, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(1,260) = 41,31$; $p < 0,001$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, Behandlungswoche 10: Placebo vs. L-RD2RD2 $p = 0,010$).

Rotarod-Test

Die motorische Leistung der transgenen SOD1*G93A Mäuse und der nicht-transgenen Geschwistertiere wurde zusätzlich im Rotarod-Test alle zwei Wochen evaluiert. Die Latenzzeit aller transgenen Tiere betrug am ersten Versuchstag (Behandlungswoche 0) $243 \pm 5,60$ s, während die nicht-transgenen Tiere im Durchschnitt $275 \pm 4,89$ s auf dem Rotarod liefen. Es wurde eine kontinuierliche Abnahme der motorischen Leistung im Rotarod ab der Basismessung (Behandlungswoche 0) in den transgenen Behandlungsgruppen beobachtet (Abb. 20 d, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(3,239) = 63,38$; $p < 0,001$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, Behandlungswoche 0: ntg vs. Placebo $p = 0,041$ und ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 $p = 0,030$). Die motorische Leistung der transgenen SOD1*G93A Mäuse wurde wöchentlich signifikant defizitärer im Vergleich zur motorischen Leistung nicht-transgener Geschwistertiere (Abb. 20 d, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(3,239) = 63,38$; $p < 0,001$, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, Behandlungswoche 10: ntg vs. Placebo $p = 0,041$ und ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2

p = 0,030). Die Leistung der L-RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse blieb innerhalb der ersten zwei Behandlungswochen auf demselben motorischen Leistungsniveau (Latenzzeit L-RD2RD2: Behandlungswoche 0 = 245 ± 6,34 s vs. Behandlungswoche 2 = 244 ± 10,3 s), während sich die motorische Leistung der Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Versuchsgruppe um - 24,1 ± 11,4 s verringerte (Placebo: Behandlungswoche 0 = 243 ± 9,48 s vs. Behandlungswoche 2 = 218 ± 8,18 s).

Trotz des kontinuierlichen motorischen Leistungsverlustes der L-RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Versuchsgruppe über die gesamte Versuchsdauer, wurde in den ersten zwei Behandlungswochen ein signifikanter Unterschied in der motorischen Leistungsfähigkeit im Vergleich zu der Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen detektiert (Abb. 20 d, zweifaktorielle wiederholte ANOVA, $f(1,156) = 8,72$; p = 0,007, Fisher's LSD Post-hoc Analyse, Behandlungswoche 2: Placebo vs. L-RD2RD2 p = 0,043). Die Behandlung mit L-RD2RD2 verzögerte signifikant den motorischen Phänotyp von SOD1*G93 Mäusen in der frühen Behandlungsphase.

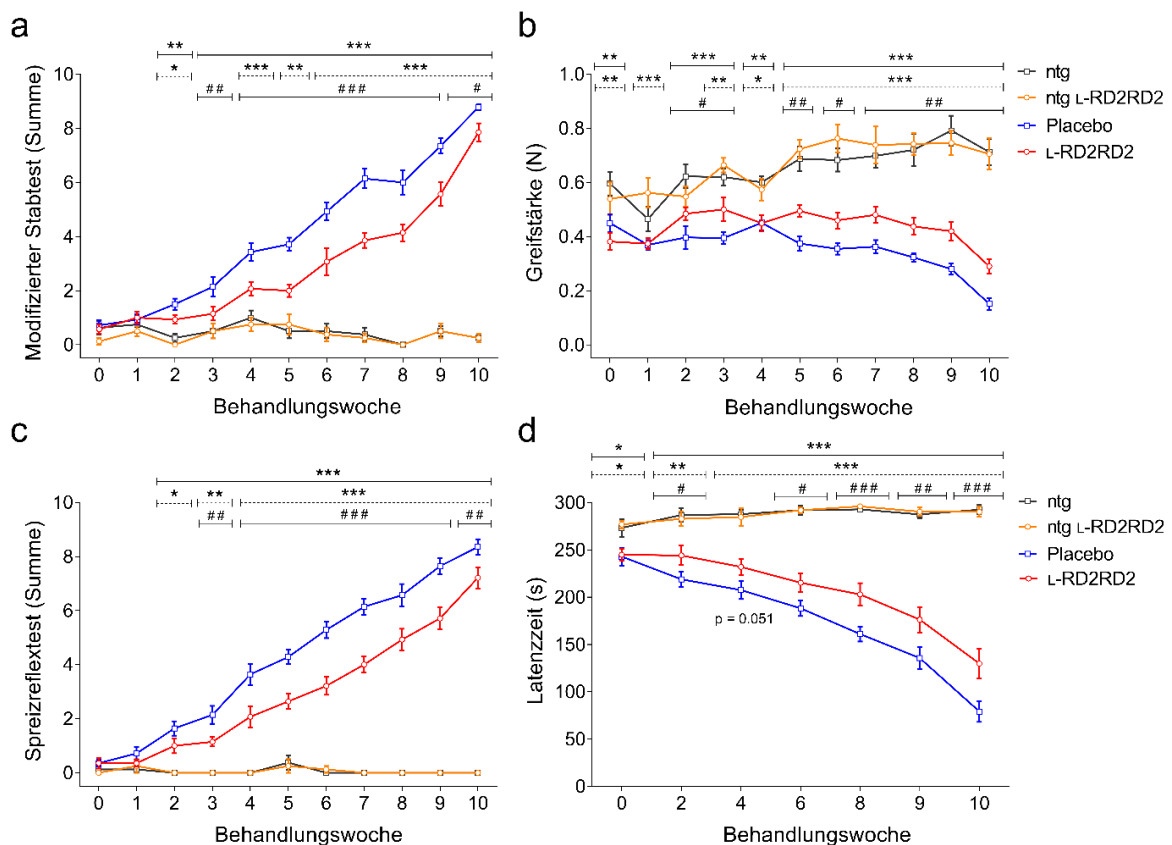


Abb. 20 Stagnation der motorischen Leistung bei L-RD2RD2-behandelten SOD1*G93A Mäusen in den motorische Tests.

In allen motorischen Tests (modifizierter Stabtest (a) Greifstärke- (b) und Spreizreflextest der Hinterbeine (c), sowie im Rotarod-Test (d)) war eine Verbesserung des motorischen Phänotyps der L-RD2RD2- vs. Placebo-behandelter SOD1*G93A Mäuse in den ersten Behandlungswochen

feststellbar. Alle L-RD2RD2-behandelten, nicht-transgenen Mäuse wiesen während des gesamten Versuchszeitraums normale motorische Fähigkeiten wie die Placebo-behandelten, nicht-transgenen Geschwistertiere auf. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Die statistischen Berechnungen wurden mittels zweifaktorieller wiederholter ANOVA mit anschließendem Fisher's LSD Post-hoc durchgeführt. Die Sternchen (*) und die Rauten (#) weisen auf eine Signifikanz zwischen den Behandlungsgruppen hin (ntg vs. tg SOD1*G93A: * $p = 0,05$, ** $p = 0,01$, *** $p < 0,001$ und Placebo vs. L-RD2RD2: # $p = 0,05$, ## $p = 0,01$, ### $p < 0,001$). ntg: nicht-transgen, tg: transgen

Krankheitsprogression und Überlebenszeitanalyse

In den Verhaltensanalysen zeigte sich, dass die Progression des Phänotyps in den L-RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen signifikant verlangsamt werden konnte, vor allem in der frühen Behandlungsphase. Daher wurde zusätzlich überprüft, ob die Behandlung mit L-RD2RD2 Auswirkungen auf den Zeitpunkt des Krankheitsbeginns und auf die Überlebenszeit der transgenen Tiere hatte. Unter Anwendung definierter Kriterien nach Mead *et al.* (2011) (Mead *et al.*, 2011) wurden der Spreizreflex und Tremor der Hintergliedmaßen bewertet, um den Krankheitsbeginn zu definieren. Die Kaplan-Meier-Analyse verglich den Krankheitsbeginn und das Überleben zwischen den L-RD2RD2- und Placebo-behandelten Mäusen eines Genotyps (ntg vs. ntg L-RD2RD2 und Placebo vs. L-RD2RD2).

Die Analyse der Daten L-RD2RD2-behandelter, transgener SOD1*G93A Mäuse bestätigte eine Verzögerung des durchschnittlichen Krankheitsbeginns gegenüber Placebo-behandelten SOD1*G93A Mäusen (Abb. 21 a und Tab. 5, Kaplan-Meier-Analyse mit Log-Rank-Test, Placebo vs. L-RD2RD2 $p < 0,001$). Der durchschnittliche Krankheitsbeginn von L-RD2RD2-behandelten SOD1*G93A Mäusen lag bei 114 Tagen ($n = 14$, zwischen 107 Tagen $\pm$ 124 Tage) und der durchschnittliche Krankheitsbeginn von Placebo-behandelten, transgenen Geschwistertieren bei 106 Tage ($n = 14$, zwischen 96 Tagen $\pm$ 118 Tage). Obwohl der Krankheitsausbruch L-RD2RD2-behandelter SOD1*G93A Mäusen signifikant verzögert wurde, bewirkte die Behandlung mit L-RD2RD2 keine signifikant verlängerte Überlebenszeit in SOD1*G93A Mäusen im Vergleich mit Placebo-behandelten Geschwistertieren (Abb. 21 b). Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve zeigt, dass die mit L-RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse ein mittleres Überleben von 162 Tagen ($n = 14$, zwischen 150 Tagen $\pm$ 174 Tage) und die mit Placebo-behandelten, transgenen Geschwistertiere von 159 Tagen ($n = 14$, zwischen 150 Tagen $\pm$ 172 Tage) aufwiesen. Die Behandlung mit L-RD2RD2 hatte keinen Einfluss auf das Überleben von nicht-transgenen Mäusen. Die Gruppen von nicht-transgenen Mäusen lebten nach dem Ende der Studie ohne erkennbare Nebenwirkungen. Weder die L-RD2RD2-, noch die Placebo-behandelte, nicht-transgene Versuchsgruppe zeigten Krankheitssymptome in

irgendeiner Art (Tab. 5, Kaplan-Meier-Analyse mit Log-Rank-Test, ntg vs. ntg L-RD2RD2 $p = 0,275$ (ns)). Die Behandlung mit L-RD2RD2 hatte ebenso keinen Einfluss auf das Überleben der nicht-transgenen Mäuse und entsprach der Überlebenszeit Placebo-behandelter, nicht-transgener Geschwistertiere (Tab. 6, Kaplan-Meier-Analyse mit Log-Rank-Test, ntg vs. ntg L-RD2RD2 $p = 0,275$ (ns)). Die nicht-transgenen Tiere wurden für weitere histologische Untersuchungen, eine Woche nach dem das letzte transgene Tier die Abbruchkriterien erreicht hatte, getötet.

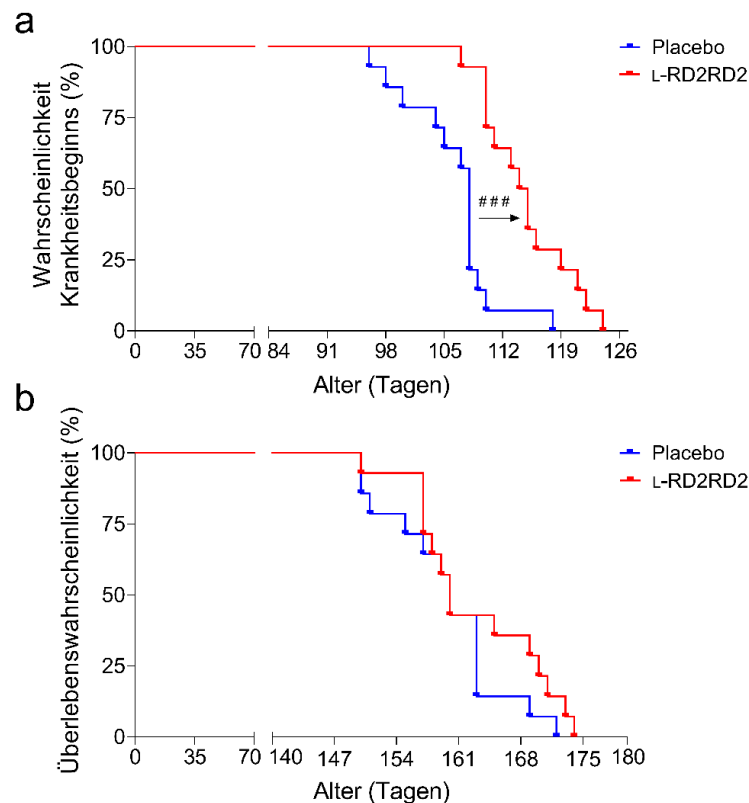


Abb. 21 Berechnung des Zeitpunktes “Krankheitsbeginn” und Überlebensanalyse der transgenen Behandlungsgruppen.

Anhand der beschriebenen Parameter im Kapitel 4.1.2 wurde die Wahrscheinlichkeit des Zeitpunktes Krankheitsbeginn (a) und die Überlebenszeit berechnet (b). Die Behandlung mit L-RD2RD2 verzögerte den Krankheitsbeginn signifikant in den transgenen SOD1*G93A Mäusen (a, Log-Rank-Test, $p < 0,001$), verlängerte die Überlebenszeit der behandelten SOD1*G93A Mäuse gegenüber den mit Placebo-behandelten Geschwistertieren jedoch nur geringfügig (b, Log-Rank-Test, $p = 0,237$). Die Behandlung mit L-RD2RD2 hatte keinen Einfluss auf das Überleben der nicht-transgenen Mäuse. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Die statistischen Berechnungen wurden mittels Kaplan-Meier-Analyse mit Log-Rank-Test durchgeführt. Die Rauten (#) weisen auf eine Signifikanz zwischen den transgen Behandlungsgruppen hin (Placebo vs. L-RD2RD2: ### $p < 0,001$).

Tab. 5 Zeitpunkt Krankheitsbeginn - Deskriptive Statistik und Normalverteilung der vier Behandlungsgruppen.

In einer ersten deskriptiven Analyse wurden die Parameter Mittelwert, Standardabweichung, Median sowie Minimum und Maximum in Bezug auf den Zeitpunkt Krankheitsbeginn ermittelt. Die statistischen Berechnungen wurden mittels Kaplan-Meier-Analyse mit Log-Rank-Test durchgeführt. Ein p-Wert von $\geq 0,05$ wurde als statistisch nicht signifikant (ns) angesehen. n: Anzahl der untersuchten Tiere pro Versuchsgruppe, Min: Minimum, Max: Maximum, ns: nicht signifikant, ntg: nicht-transgen, SD: Standardabweichung, tg: transgen

Geno- typ	Behand- lung	Tiere	Mittelwert	SD	Median	Min	Max	Normal- verteilung	Log- Rank
		(n)	Alter (Tagen)		Alter (Tagen)				
ntg	Placebo	8	179	0,46	179	179	180	nein	p = 0,275 (ns)
	L-RD2RD2	8	179	1,28	179	178	182	ja	
tg	Placebo	14	106	1,47	108	96	118	ja	p < 0,001
	L-RD2RD2	14	114	1,37	115	107	124	ja	

Tab. 6 Überlebenszeit - Deskriptive Statistik und Normalverteilung der vier Behandlungsgruppen.

In einer zweiten deskriptiven Analyse wurden die Parameter Mittelwert, Standardabweichung, Median sowie Minimum und Maximum in Bezug auf die Tage der Überlebenszeit ermittelt. Die statistischen Berechnungen wurden mittels Kaplan-Meier-Analyse mit Log-Rank-Test durchgeführt. Ein p-Wert von $\geq 0,05$ wurde als statistisch nicht signifikant (ns) angesehen. n: Anzahl der untersuchten Tiere pro Versuchsgruppe, Min: Minimum, Max: Maximum, ns: nicht signifikant, ntg: nicht-transgen, SD: Standardabweichung, tg: transgen

Geno- typ	Behand- lung	Tiere	Mittelwert	SD	Median	Min	Max	Normal- verteilung	Log- Rank
		(n)	Alter (Tagen)		Alter (Tagen)				
ntg	Placebo	8	179	0,46	179	179	180	nein	p = 0,275 (ns)
	L-RD2RD2	8	179	1,28	179	178	182	ja	
tg	Placebo	14	159	6,65	160	150	172	ja	p = 0,237 (ns)
	L-RD2RD2	14	162	7,38	160	150	174	ja	

4.2.2.3 Histologische Untersuchungen

Am Ende der kurativen Behandlungsstudie wurden allen Mäusen Gewebeproben (Hirn, Rückenmark und *M. gastrocnemius*) für immunhistochemische Analysen entnommen und untersucht, wie in den Kapitel 4.1.6 und 4.1.7 beschrieben.

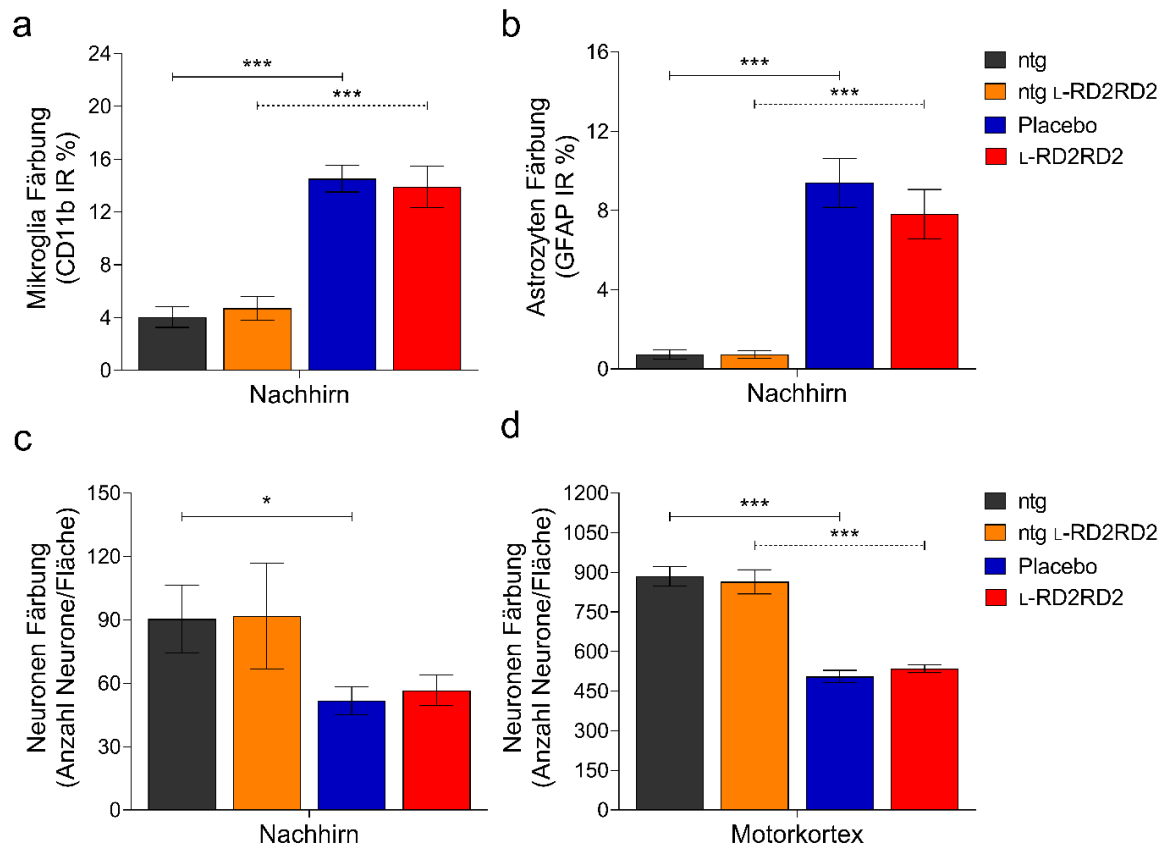


Abb. 22 Immunhistochemische Analyse der ALS-ähnlichen Pathologie im Hirnstamm und im motorischen Kortex nach Behandlung mit L-RD2RD2.

Aktivierte Mikroglia (a) und Astrozyten (b) im Hirnstamm wurden nach Abschluss der Studie analysiert. Zusätzlich wurde die Anzahl an Neuronen im Hirnstamm (c) und motorischen Kortex (d) untersucht. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Die statistischen Berechnungen wurden mittels einfaktorieller ANOVA mit anschließendem Fisher's LSD Post-hoc durchgeführt. Die Sternchen (*) weisen auf eine Signifikanz zwischen den nicht-transgenen und transgenen Behandlungsgruppen hin (ntg vs. tg SOD1*G93A: * $p = 0,05$, *** $p < 0,001$). IR: Immunreaktive Fläche (%), ntg: nicht-transgen, tg: transgen

Die Analyse der histopathologischen Quantifizierungen ergab eine signifikant gesteigerte neuroinflammatorische Reaktion im Nachhirn transgener SOD1*G93A Mäuse (Abb. 22 a und Tab. 7, Mikroglia: ntg vs. Placebo $p < 0,001$ und ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 $p < 0,001$; Abb. 22 b und Tab. 7, Astrozyten: ntg vs. Placebo $p < 0,001$ und ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 $p < 0,001$), sowie eine signifikante Neurodegeneration im Nachhirn und Motorkortex transgener SOD1*G93A Mäuse (Abb. 22 c und Tab. 7, Nachhirn: ntg vs.

Placebo $p = 0,036$; Abb. 22 d und Tab. 7, Motorkortex: ntg vs. Placebo $p < 0,001$ und ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 $p < 0,001$). Zwischen den L-RD2RD2- und Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen wurde keine signifikante Reduktion der Gliose oder ein signifikantes Neuronen-Überleben gefunden (Abb. 22 und Tab. 7).

Tab. 7 Analyse der ALS-ähnlichen Pathologie von L-RD2RD2- und Placebo-behandelten SOD1*G93A Mäusen und nicht-transgenen Geschwistertieren.

Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Die statistischen Berechnungen wurden mittels einfaktorieller ANOVA mit anschließendem Fisher's LSD Post-hoc durchgeführt. Ein p-Wert von $\geq 0,05$ wurde als statistisch nicht signifikant (ns) angesehen. Die Sternchen (*) weisen auf eine Signifikanz zwischen den nicht-transgenen und transgenen Behandlungsgruppen hin (ntg vs. tg SOD1*G93A: * $p = 0,05$, *** $p < 0,001$). IR: Immunreaktive Fläche (%). IR: Immunreaktive Fläche (%), ns: nicht signifikant, ntg: nicht-transgen, tg: transgen

IR (%)	Fläche	ntg	ntg L-RD2RD2	Placebo	L-RD2RD2	Statistik
Mikroglia	Nach-hirn	3,41 $\pm$ 0,67	4,21 $\pm$ 0,72	13,08 $\pm$ 0,87***	12,44 $\pm$ 1,22***	F(3,37) = 22,4; $p < 0,001$ ntg vs. Placebo $p < 0,001$ ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 $p < 0,001$ ntg vs. ntg L-RD2RD2 $p = 0,654$ (ns) Placebo vs. L-RD2RD2 $p = 0,620$ (ns)
Astrozyten	Nach-hirn	0,74 $\pm$ 0,23	0,73 $\pm$ 0,19	9,39 $\pm$ 1,23***	7,82 $\pm$ 1,24***	F(3,39) = 15,8; $p < 0,001$ ntg vs. Placebo $p < 0,001$ ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 $p < 0,001$ ntg vs. ntg L-RD2RD2 $p = 0,997$ (ns) Placebo vs. L-RD2RD2 $p = 0,271$ (ns)
Anzahl	Fläche	ntg	ntg L-RD2RD2	Placebo	L-RD2RD2	Statistik
Neurone	Nach-hirn	90,4 $\pm$ 16,4	91,7 $\pm$ 25,0	51,7 $\pm$ 6,26*	56,7 $\pm$ 7,27	F(3,37) = 2,91; $p = 0,047$ ntg vs. Placebo $p = 0,036$ ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 $p = 0,054$ (ns) ntg vs. ntg L-RD2RD2 $p = 0,950$ (ns) Placebo vs. L-RD2RD2 $p = 0,737$ (ns)
	Motor kortex	884 $\pm$ 36,2	863 $\pm$ 46,1	505 $\pm$ 23,4***	534 $\pm$ 14,8***	F(3,37) = 50,2; $p < 0,001$ ntg vs. Placebo $p < 0,001$ ntg L-RD2RD2 vs. L-RD2RD2 $p < 0,001$ ntg vs. ntg L-RD2RD2 $p = 0,654$ (ns) Placebo vs. L-RD2RD2 $p = 0,411$ (ns)

Darüber hinaus weisen die Daten auf keine Veränderung in der Pathologie L-RD2RD2-behandelter, nicht-transgener Mäuse im Vergleich zu den Placebo-behandelten, nicht-transgenen Geschwistertieren hin (Abb. 22 und Tab. 7). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die L-RD2RD2-Behandlung bei gesunden Mäusen keine Nebenwirkungen hatte.

Nach der immunhistochemischen Quantifizierung der Astrozyten, Mikroglia und Neurone in den Hirnschnitten wurde festgestellt, dass in der Therapiestudie die L-enantiomere Form von RD2RD2 appliziert wurde, anstelle der D-Form. Die weiteren Gewebeproben vom Rückenmark und *M. gastrocnemius*, sowie die gewonnenen Plasmaproben wurden nicht weiter analysiert und sollen als Kontrollen für zukünftige Therapiestudien verwendet werden.

5 Diskussion

Die ALS ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, die das motorische Nervensystem betrifft (Cleveland and Rothstein, 2001, Kiernan et al., 2011, Longinetti and Fang, 2019). Aufgrund der alternden Weltbevölkerung kam es in den letzten Jahrzehnten zu einer steigenden Inzidenz von ALS Fällen (Arthur et al., 2016). Trotz intensiver Forschung ist die Ursache immer noch unbekannt und die Behandlung derzeit nur symptomatisch möglich (Ludolph, 2014, Dorst et al., 2017). Es gibt immer mehr Belege dafür, dass bei der ALS eine Dysregulierung des Immunsystems zu umfangreichen Entzündungsreaktionen führt. (McCauley and Baloh, 2019, Beers and Appel, 2019). Frühere Studien zeigen, dass die durch die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten verursachte Neuroinflammation (Boillée et al., 2006, Hensley et al., 2006, Haidet-Phillips et al., 2011), eine Schlüsselrolle bei der Krankheitsprogression einnimmt. Aus diesem Grund scheint es ein vielversprechender Ansatz in der ALS Forschung zu sein, durch eine modulierende Beeinflussung der Neuroinflammation der Entwicklung der ALS entgegen zu wirken.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war in drei Abschnitte gegliedert. Zuerst wurde der Phänotyp des transgenen SOD1*G93A Mausmodells während der Krankheitsprogression, zusammen mit nicht-transgenen Geschwistertieren (wildtypische Kontrollgruppe), in verschiedenen Verhaltens- und motorischen Tests charakterisiert. Im nächsten Abschnitt dieser Doktorarbeit wurde untersucht, ob die Behandlung transgener SOD1*G93A Mäuse mit RD2RD2 einen Einfluss auf die Progression des neurodegenerativen Phänotyps und der Neuroinflammation der ALS gegenüber nicht-behandelten, transgenen Geschwistertieren hat. Zu diesem Zweck wurde RD2RD2 mit zwei verschiedene Applikationsformen unterschiedlicher Dosierung über zwei unterschiedlich lange Therapiezeiträumen verabreicht (i.p. 10 mg/kg über 28 Tagen und p.o. 50 mg/kg täglich für neun Wochen). In einer Überlebensstudie (kurative Therapiestudie) sollte darauffolgend der Einfluss von RD2RD2 auf nicht-transgene Mäuse und transgene SOD1*G93A Geschwistertiere untersucht werden. Aufgrund einer Fehllieferung des Peptidherstellers wurde den Mäusen in der Überlebensstudie die L-Form des Peptids appliziert wie in Kapitel 4.1.1 erklärt.

5.1 Charakterisierungsstudie

Die frühe Entdeckung der Mutation des humanen SOD1 Gens in Zusammenhang mit der sALS und fALS (Rosen et al., 1993, Renton et al., 2014, Taylor et al., 2016) führte zur Entwicklung mehrerer Tiermodelle für die ALS Grundlagenforschung (Gurney et al., 1994, Aoki et al., 2005, Joyce et al., 2011). Vor allem das transgene SOD1*G93A Mausmodell weist eine hohe Ähnlichkeit mit dem klinischen und pathologischen Krankheitsbild von ALS Patienten auf (Alexianu et al., 2001, Bendotti and Carri, 2004, Acevedo-Arozena et al., 2011, Beers et al., 2011a). Das etablierte und intensiv charakterisierte SOD1*G93A Mausmodell ist ein Standardmodell der ALS Forschung und aus diesem Grund für die Erforschung von neuen Wirkstoffen in präklinischen Therapiestudien gegen die ALS geeignet. Da verschiedene endogene Faktoren, wie z.B. das Geschlecht, das Alter oder der weibliche Zyklusstand und exogene Faktoren, wie z.B. das Haltungssystem, das Futter oder die Beleuchtung in einem Tierhaltungsraum, einen Einfluss auf das Verhalten und die Ausprägung klinischer Symptome der Versuchstiere haben können, wurde vor der ersten präklinischen Therapiestudie, und zur Vergleichbarkeit der ermittelten Daten mit der Literatur, eine Pilotstudie zur spezifischen Charakterisierung des Phänotyps von weiblichen SOD1*G93A Mäusen während der Krankheitsprogression durchgeführt. Des Weiteren wurde das Behandlungszeitfenster für die erste präklinische Therapiestudie definiert.

Verhaltenstests

Weibliche transgene SOD1*G93A Mäuse und nicht-transgene Geschwistertiere wurden in regelmäßigen Intervallen in verschiedenen Verhaltens- und Motortests untersucht (Kapitel 4.1.2). Zusätzlich wurden alle Tiere wöchentlich mehrmals analog dem durch das LANUV genehmigten Beurteilungsbogen (Scoresheet) begutachtet und gewogen. In der Pilotstudie sollte der Phänotyp der transgenen Mäuse während der Progression des Phänotyps vom gesunden Tier bis zum Einsetzen einer schwerwiegenden Symptomatik charakterisiert werden. Zu Beginn der Pilotstudie, das Alter der Mäuse betrug vier Wochen, wiesen die transgenen Tiere keine sichtbaren klinischen Symptome der ALS Erkrankung auf und ihre Leistung in den Verhaltenstests entsprach derer nicht-transgener Geschwistertiere mit Ausnahme des Rotarod-Tests (Kapitel 4.2.1.1 und 4.2.1.2.). Von Versuchsbeginn an war eine signifikant verringerte motorische Leistung der transgenen SOD1*G93A Mäuse im Rotarod-Test messbar. Seitdem die transgene SOD1*G93A Mauslinie in unserem Labor etabliert ist, beobachten wir immer wieder, dass die transgenen SOD1*G93A Mäuse von Geburt an in ihrer Körperanatomie kleiner sind als ihre gleichaltrigen, nicht-transgenen Geschwistertiere, genau wie der Wurf transgener SOD1*G93A Mäuse der Pilotstudie. Aufgrund des Unterschieds in der Körperanatomie und keiner weiteren festgestellten

Defizite, z.B. im Körpergewicht der transgenen SOD1*G92A Mäuse, kann man schlussfolgern, dass die nicht-transgenen Mäuse einen Vorteil durch die größere Körperanatomie besaßen und somit einen Vorteil beim Laufen auf der sich drehenden Walze in den ersten Versuchswochen hatten. Diese Annahme wird durch die bis in die 7. Woche zunehmende motorische Leistung der transgenen SOD1*G93A Mäuse im Rotarod-Test unterstützt. Dies wird durch andere Verhaltensstudien unterstützt, in denen nur eine begrenzte Sensitivität des Rotarod-Tests bis zum Erreichen einer schweren Symptomatik gezeigt ist (Fischer et al., 2005, Apolloni et al., 2013).

Mit zunehmenden Alter kam es zur Progression des motorisch-neurodegenerativen Phänotyps, in Folge dessen es zu einer steigenden, defizitären motorischen Leistung der transgenen SOD1*G93A Mäuse kam. Sichtbar war dies zum einen in der MRT-Messung, sowie in den Verhaltenstests (Kapitel 4.2.1.3). Die Daten aus der durchgeführten MRT-Messung ergaben eine signifikante Reduzierung im Volumen und Gewicht des Zwillingswadenmuskels *M. gastrocnemius* von transgenen und nicht-transgenen Geschwistertieren im Alter von zehn Wochen. Der Zwillingswadenmuskel ist für die Flexion des Knie- und Sprunggelenks verantwortlich (Mohan et al., 2014). Durch die progressive Atrophie der Hinterbeinmuskulatur als Folge der Krankheitsprogression degeneriert der Muskel und die motorische Leistung der transgenen Mäuse wird vermindert (Mohajeri et al., 1998, Brooks et al., 2004, Mead et al., 2011). Dieses motorische Defizit wurde früh in der SHIRPA-Testbatterie (motorische Parameter) und dem modifizierten Stabtest detektiert, während die signifikant reduzierte motorische Leistung der transgenen SOD1*G93A Mäuse im Spreiz- und im Greifstärketest erstmals im Lebensalter von 12 Wochen detektiert wurde (Kapitel 4.2.1.1). In der Ganganalyse per Fußabdrucktest wurden im Alter von 16 Wochen weitere signifikante Defizite in der Motorik der transgenen SOD1*G93A Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe messbar (Kapitel 4.2.1.2). Der Fußabdrucktest wird dazu verwendet, um das Laufverhalten von Mäusen zu untersuchen und um Bewegungsstörungen festzustellen (Jaworski et al., 2006). Die Schrittcharakteristik der transgenen Tiere veränderte sich ab der 16. Lebenswoche (Abb. 14). Die Zwischenschrittlänge der transgenen SOD1*G93A Mäuse war signifikant verkürzt, wodurch die Tiere mehr Schritte benötigten, um die geforderte Laufstrecke zurückzulegen. Aufgrund der Atrophie der Hinterbeinmuskulatur veränderte sich das Laufverhalten der transgenen Tiere, die den Muskelschwund in den Hinterbeinen und einem damit verbundenen unsicheren Gang durch kleinere Schritte zu kompensieren versuchten. Ähnliche Ergebnisse wurden in anderen Tierversuchsstudien mit dem SOD1*G93A Mausmodell dokumentiert (Garbuzova-Davis et al., 2002, Golko-Perez et al., 2017). Im Offenfeldtest konnte erstmals im Alter von 20 Wochen eine geringere motorische Aktivität der transgenen

SOD1*G93A Mäuse im Vergleich zu der nicht-transgenen Kontrollgruppe detektiert werden. Dies weist daraufhin, dass trotz der ansteigenden defizitären motorischen Leistung der transgenen SOD1*G93A Mäusen, die von *Mead et al.* (2011) als „schwerwiegend“ beschriebene Symptomatik (Mead et al., 2011) bis zur Beendigung der Pilotstudie mit 20 Wochen ausblieb.

Die transgenen SOD1*G93A Mäuse zeigten in den ersten Versuchswochen nur geringfügige Verhaltensänderungen verglichen mit gleichaltrigen nicht-transgenen Geschwistertieren (SHIRPA-Testbatterie, Kapitel 4.2.1.1). Im Offenfeldtest konnte über den gesamten Versuchszeitraum von 16 Wochen keine durch die Krankheitsprogression verursachende Veränderung im Verhalten der transgenen Tiere im Vergleich zu der Kontrollgruppe detektiert werden (Kapitel 4.2.1.1). Die Ergebnisse der Verhaltensparameter aus dem SHIRPA-Test und dem Offenfeldtest weisen ebenfalls daraufhin, dass die Progression des motorisch-neurodegenerativen Phänotyps weniger weit fortgeschritten war als in den gleichaltrigen, transgenen Tieren in der Studie von *Mead et al.* (2011) (Mead et al., 2011).

Das Behandlungszeitfensters für die erste präklinische Therapiestudien wurde in Anlehnung an die Publikation von *Mead et al.* (2011) gewählt (Mead et al., 2011). Die Forschergruppe definierte den „Krankheitsbeginn“ anhand phänotypischer Parameter (Kapitel 4.1.2), welche die transgenen Tiere im Versuch von *Mead et al.* (2011) im Alter von 11 Wochen zeigten. Die in der Pilotstudie erhobenen Daten, nach den Kriterien von *Mead et al.* (2011) ausgewertet, zeigten einen „Krankheitsbeginn“ mit einem Alter von 16 Wochen für die transgenen SOD1*G93A Mäuse unserer Kohorte. Im Vergleich mit den Ergebnissen von *Mead et al.* (2011) ist die Ausprägung des Phänotyps der transgenen SOD1*G93A Mäuse zeitlich um fünf Wochen verschoben. Die verschiedenen Verhaltenstests verifizierten dieses Ergebnis. Die einfachste Erklärung für diese Diskrepanz zu *Mead et al.* (2011) könnte die Variabilität durch unterschiedliche Experimentatoren sein. Darüber hinaus wurden die Tiere in dieser ersten Studie „nur“ in einem zweiwöchigen Versuchsintervall auf den Verlust des Spreizreflexes und der Entwicklung eines Tremors in den Hinterbeinen begutachtet, die zur Definierung des Zeitpunkts „Krankheitsbeginn“ genutzt wurden (diese zwei Parameter waren zu diesem Zeitpunkt kein Begutachtungskriterium des Scoresheets). Dies bedeutet, dass es sein könnte, dass der „reale“ Zeitpunkt „Krankheitsbeginn“ in unserer Kohorte zwischen der 14. Lebenswoche (nach Ende der Verhaltenstests) und der 16. Lebenswoche gelegen hat. Eine weitere Erklärung könnte in der Genetik des von *Mead et al.* (2011) verwendeten C57BL/6J OlaHsd Mausunterstamms zur Zucht der transgenen SOD1*G93A Mäuse liegen. Die SOD1*G93A Tiere wurden über 20 Generationen mit B6.SJL.Tg(SOD1*G93A)1Gur/J Männchen x

C57BL/6J OlaHsd Weibchen zurückgekreuzt (Mead et al., 2011). Der C57BL/6J OlaHsd ist ein Unterstamm des ursprünglichen C57BL/6J Mausstamms der Firma *The Jackson Laboratory* (C57BL/6-J, Nr. #000664) (Specht and Schoepfer, 2001) für den gezeigt wurde, dass es phänotypische Verhaltensunterschiede gegenüber dem C57BL/6J Mausstamm gibt (Peña-Oliver et al., 2014, Siegmund et al., 2005). Phänotypische Verhaltensunterschiede finden sich auch schon zwischen den verschiedenen C57BL/6 Mausstämmen (Bryant et al., 2008, Matsuo et al., 2010). Matsuo et al. (2010) merken an, dass der gewählte Mausstamm Einfluss auf den mutierten Phänotyp haben kann. Es besteht auch die Möglichkeit, dass feine genetische Variationen/Gen-Interaktionen zwischen den Unterstämmen epistatisch mit der Mutation interagieren, d.h. dass ein Gen die Unterdrückung der phänotypischen Ausprägung eines anderen Gens unterschiedlich stark beeinflusst, was wiederum Einfluss auf den Phänotyp des Nachwuchses haben kann (Jackson et al., 2002, Tyler et al., 2017). Des Weiteren ist publiziert, dass transgene SOD1*G93A Tiere aus der Zucht der kongenen Mauslinie B6.Cg.Tg(SOD1*G93A)1Gur/J mit C57BL/6J Mäusen einen späteren Krankheitsbeginn mit durchschnittlich 90 bis 110 Tagen aufweisen, als der Nachwuchs der hybriden Mauslinie B6.SJL.Tg(SOD1*G93A)1Gur/J aus der Zucht mit C57BL/6J Mäusen (Pfohl et al., 2015). Zu den zuletzt genannten Zuchttieren zählen die von Mead et al (2011) getesteten transgenen SOD1*G93A Mäuse. Zudem ist der Zeitpunkt „Krankheitsbeginn“ in weiblichen SOD1*G93A Mäusen verzögert, verglichen mit männlichen transgenen SOD1*G93A Geschwistertieren (Hayworth and Gonzalez-Lima, 2009, Pfohl et al., 2015).

Neben der defizitären Motorik wird das Körpergewicht der transgenen Mäuse als ein Parameter zur Beurteilung der phänotypischen Krankheitsprogression im transgenen SOD1*G93A Mausmodell eingesetzt (Weydt et al., 2003, Garbuzova-Davis et al., 2007b, Marcuzzo et al., 2011, Hatzipetros et al., 2015, Kreilau et al., 2020). Mit dem Auftreten erster motorischer Defizite stagniert das Körpergewicht der transgenen Tiere, gefolgt von einem stetigen Gewichtsverlust in Abhängigkeit von der Schwere der motorischen Defizite. Die Stagnation des Körpergewichtes der transgenen SOD1*G93A Mäuse wurde erstmals von der 14. Lebenswoche auf die 15. Lebenswoche dokumentiert. Eine Reduzierung des Körpergewichtes nach der 16. Lebenswoche, wie u.a. von Lewis et al. (2014) beschrieben (Lewis et al., 2014), wiesen die transgenen SOD1*G93A Tiere bis zum Versuchsende nicht auf. Zum einen aufgrund der nicht so weit fortgeschrittenen Progression des Phänotyps und zum anderen aufgrund der behördlichen Bestimmungen, den Tieren ab der 13. Woche zusätzlich Futter und Wasser in Form eines Futtergellkissens auf den Käfigboden zu legen. Letzteres hat einen Einfluss auf den Parameter Körpergewicht. Für die übliche Futter- und Trinkwasseraufnahme müssen sich die Mäuse auf die Hinterbeine stellen und

hochstrecken. Durch das Gelkissen wurde die weitere Futter- und Wasseraufnahme gewährleistet, unabhängig von der körperlichen Verfassung eines Tieres, wodurch eine Beeinträchtigung auf den Parameter „Körpergewicht“ nicht ausgeschlossen werden kann. Unsere Ergebnisse unterstützten frühere Beobachtungen, dass das Gewicht der kongenen SOD1*G93A Mäuse über mehrere Wochen zweitweise stagniert, während die motorischen Defizite weiter signifikant messbar voranschreiten (Apolloni et al., 2013, Lewis et al., 2014). Das absolute Gewicht (g) sollte daher nicht als primärer Faktor zur Beurteilung der phänotypischen Krankheitsprogression im Mausmodell genutzt werden.

Die erhobenen Daten der Pilotstudie zeigen, dass sich die Ausprägung des spezifischen Phänotyps der transgenen SOD1*Mäuse in unserer hausinternen Kohorte zeitlich gegenüber der Kohorte von *Mead et al.* (2011) verzögert. Unter Berücksichtigung des als „Krankheitsbeginn“ bezeichneten Zeitpunktes, an dem die transgenen Tiere gleichzeitig einen Spreizungsdefekt und Tremor in den Hinterbeinen zeigten, und der in den verschiedenen Verhaltenstests (SHIRPA-Test, modifizierter Stabtest, Greifstärketest und Spreiztest der Hinterbeine) festgestellten motorischen Defizite im Alter von 12 Wochen, wurde der Behandlungsstart der ersten präklinischen Therapiestudie auf ein Alter von 12 Wochen festgelegt. Der Zeitpunkt wurde vier Wochen vor dem Zeitpunkt „Krankheitsbeginn“ gelegt, da zuerst in einer präventiven Behandlung untersucht werden sollte, ob die Behandlung mit RD2RD2 einen generellen therapeutischen Effekt auf den neurodegenerativen Phänotyp und die neuroinflammatorischen Prozesse im SOD1*G93A Mausmodell hat. Die präventiven Therapiestudien wurden mit einem Alter der Tiere von 16 Wochen beendet.

Anpassungen für die Therapiestudien

Der Fußabdrucktest war von allen motorischen Tests in seiner Ausführung am zeitaufwändigsten und am wenigsten sensitiv zur Detektion motorischer Defizite im Vergleich zum modifizierten Stabtest, dem Greifstärketest oder dem Spreizreflextest. Aus diesen Gründen wurde der Test in den Therapiestudien nicht weiter durchgeführt. Des Weiteren wurde beschlossen, die unten aufgeführten Verhaltenstests wöchentlich durchzuführen, da festgestellt wurde, dass ein zweiwöchiges Versuchsintervall für den SHIRPA-Test, modifizierten Stabtest, Greifstärke- und Spreizreflextest der Hinterbeine zur Beurteilung der phänotypischen Krankheitsprogression und der potentiell therapeutischen Wirkung von RD2RD2 in diesem Mausmodell ein zu großer Zeitabstand ist, um die Progression des motorisch-neurodegenerativen Phänotyps zu monitorieren. Zudem wurde das MRT Messverfahren zur Detektion der Neurodegeneration im *M. gastrocnemius* gegen das PET getauscht. Bei RD2RD2 handelt es sich um ein potentiell antiinflammatorisch

wirkendes Peptid. Es besteht eine Korrelation zwischen Aktivierung von Mikrogliazellen und dem Schweregrad der ALS Symptome (Hall et al., 1998, Boillée et al., 2006, D'Ambrosi et al., 2009, Lewis et al., 2014). Die PET-Messungen vom Hirn wurden durchgeführt, um zusätzlich zu den histologischen Untersuchungen aktivierter Gliazellen im Gehirn den Behandlungserfolg von RD2RD2 auf die Neuroinflammation von transgenen SOD1*G93A Mäusen zu untersuchen. In einer Studie von *Corcia et al.* (2012) (Corcia et al., 2012) konnte gezeigt werden, dass die molekulare Bildgebung mittels [¹⁸F] DPA-714 (DPA; N, N-Diethyl-2-[4-phenyl]-5,7-dimethylpyrazolo [1,5-a] pyrimidin-3-acetamid) PET-Messung eine erfolgsversprechende Methode ist, therapiebegleitend einen Behandlungserfolg in Bezug auf die Neuroinflammation im Gehirn und speziell die mikrogliale Aktivierung zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden am Ende der präventiven i.p. Therapiestudie alle transgenen und nicht-transgenen Tiere im PET gemessen. In den p.o. Therapiestudien wurden die transgenen SOD1*G93A zudem ein zweites Mal im PET gemessen (1. Messung vor Behandlungsbeginn und 2. Messung am Ende der Therapiestudie), um den Behandlungseffekt von RD2RD2 auf die Neuroinflammation nachzuweisen, sowohl innerhalb der RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Versuchsgruppe (1. Messung vs. 2. Messung), als auch zwischen den RD2RD2- und Placebo behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen am Ende der Therapiestudie (RD2RD2 vs. Placebo). Die erste PET-Messung wurde vor Behandlungsbeginn durchgeführt, um eine potentielle Beeinflussung von RD2RD2 auf die Neuroinflammation ausschließen zu können. Die PET-Messungen wurden in Kooperation mit Dr. Antje Willuweit am INM-4 von M.Sc. Michael Schöneck durchgeführt. Verwendet wurde der [¹⁸F] DPA-714 Radioligand des 18 kDa Translokator Proteins, das als Marker für aktivierte Mikroglia bekannt ist. Die Daten werden z.Zt. ausgewertet und sind nicht Teil dieser Doktorarbeit. Die Erwähnung dient der Erklärung, warum die Behandlung der Tiere in den Therapiestudien nicht direkt nach Abschluss der Basismessungen gestartet sind. Darüber hinaus wurde der Beurteilungsbogen (Scoresheet) angepasst und um die Beurteilung der Parameter zum Verlust der Spreizung und der Entwicklung eines Tremors erweitert (Score: 0 = normale Spreizung beider Hinterbeine, kein Tremor; 1 = eingeschränkte Spreizung eines oder beider Hinterbeine und deutlicher Tremor in mindestens einem Bein; 2 = Tier zieht teilweise beim Laufen ein Bein nach, völliges Fehlen der Spreizung beider Hinterbeine und 3 = vollständige Lähmung von mind. 2 Gliedmaßen).

5.2 Präventive Therapiestudien

Die bisherigen Arbeiten unserer Forschungsgruppe zielten auf die Entwicklung eines Wirkstoffes zur krankheitsmodulierenden Behandlung der AD ab. Die aus D-enantiomeren Aminosäureresten aufgebauten Peptide, die *in vitro* die vielversprechendsten Ergebnisse lieferten (Olubiyi et al., 2014, Klein et al., 2017, van Groen et al., 2017, Kutzsche et al., 2017), wurden in präklinischen Behandlungsstudien an mehreren AD Mausmodellen getestet (Funke et al., 2010, van Groen et al., 2017, Kutzsche et al., 2017, Schemmert et al., 2019b, Schemmert et al., 2019a). Im Zuge dieser Forschung wurde RD2RD2 in einer Screeningkampagne gegen A β entdeckt. Trotz vielversprechender *in vitro* Ergebnisse einer durch RD2RD2 signifikant reduzierten A β -induzierten Zelltoxizität (Kutzsche et al., 2017), zeigte die *in vivo* Behandlung mit RD2RD2 in sieben Monate alten transgenen APP/PS1 Mäusen weder einen Einfluss auf die Konzentration von A β , noch auf die Performance der Tiere (Manuskript Kapitel 3.1). Dafür wurde in den RD2RD2-behandelten, transgenen AD Mäusen eine signifikante Reduzierung neuroinflammatorischer Marker nachgewiesen. Als Astrozyten-spezifischer Zellmarker diente das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und zur Identifizierung aktivierte Mikrogliazellen wurde das *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba1) verwendet. Für das APP/PS1 Mausmodell ist beschrieben, dass im Alter von sechs Monaten eine hohe Anzahl von GFAP-positiven Astrozyten und Iba1-positiven Mikrogliazellen in der Nähe der sich entwickelnden A β Ablagerungen im Kortex vorliegt (Gordon et al., 2002). Am Ende der vierwöchigen Behandlung waren die Tiere acht Monate alt und eine entsprechende Neuroinflammation wurde vorausgesetzt. Die Behandlung mit RD2RD2 reduzierte die Anzahl der aktivierten Gliazellen im Kortex und Hippocampus der behandelten APP/PS1 Mäuse nahezu auf das Niveau der nicht-transgenen Geschwistertiere, während die Placebo-behandelte, transgene SOD1*G93A Versuchsgruppe eine signifikant ausgeprägte Gliose entwickelte (Manuskript Kapitel 3.1). Des Weiteren ergab eine biochemische Analyse von Plasmaproben eine signifikante Abnahme der Zytokinspiegel in RD2RD2-behandelten, transgenen APP/PS1 Mäusen (Manuskript Kapitel 3.1). Die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wird durch die Aktivierung von Gliazellen beeinflusst (Heneka et al., 2015). Aufgrund dieser Daten wurde die Hypothese aufgestellt, dass RD2RD2 eine entzündungsmodulierende Wirkung besitzt, die zu einer geringeren Aktivierung von Gliazellen im Gehirn und damit verbundenen Senkung des Zytokinspiegels im Plasma RD2RD2-behandelter, transgener APP/PS1 Mäusen führt, ohne das RD2RD2 eine direkte Wirkung auf die A β Pathologie hat. Um die antiinflammatorische Wirkung von RD2RD2 ausführlicher zu charakterisieren, wurde ein Tiermodell gesucht, in der neuroinflammatorische Prozesse nach aktuellem Wissensstand eine Schlüsselrolle in der Krankheitsprogression spielen (Tortelli et al., 2020, Filipi et al.,

2020). Aufgrund der Ähnlichkeit humaner klinischer Merkmale und Pathologie wurde das SOD1*G93A Mausmodell ausgewählt. In der ersten präklinischen Therapiestudie wurden nicht-transgene und transgene Mäuse mittels einer i.p. implantierten osmotischen Minipumpe mit RD2RD2 oder Placebo (isotonischer Kochsalzlösung 0,9 %) über die Dauer von 28 Tagen behandelt, analog der vorherigen AD Studie.

Verhaltenstests

Anhand des SHIRPA-Tests, konnte gezeigt werden, dass die RD2RD2-Behandlung transgener SOD1*G93A Mäuse signifikant die Progression des Phänotyps verzögerte im Vergleich zu Placebo-behandelten Geschwistertieren. Während die Placebo-behandelten Mäuse innerhalb der vierwöchigen Behandlungsdauer eine signifikante Progression ihres Phänotyps zeigten, verzögerte die RD2RD2-Behandlung sowohl das Fortschreiten des spezifischen Phänotyps, als auch der motorischen Defizite in den mit D-Peptid-behandelten, transgenen SOD1*G93A Geschwistertieren (Manuskript Kapitel 3.1). Die Verlangsamung der Progression des neurodegenerativen Phänotyps in RD2RD2-behandelten SOD1*G93A Mäusen wurde durch den modifizierten Stabtest verifiziert, während die Beeinträchtigung der motorischen Leistung der Placebo-behandelten SOD1*G93A Mäuse langsam, aber signifikant voranschritt. Signifikante Veränderungen zwischen den RD2RD2- und Placebo-behandelten, transgenen Mäusen waren im SHIRPA-Test (motorische Parameter) bereits nach zwei Behandlungswochen erkennbar (Manuskript Kapitel 3.1). Wie in der Pilotstudie wurde in der präventiven i.p. Therapiestudie der Zeitpunkt „Krankheitsbeginn“ nach den Kriterien von *Mead et al.* (2011) definiert (Mead et al., 2011). Die Behandlung verzögerte den Ausbruch der Symptome bei RD2RD2-behandelten SOD1*G93A Mäusen, jedoch ergab die Kaplan-Meier-Analyse keinen signifikanten Unterschied im Zeitpunkt „Krankheitsbeginn“ zur Placebo-behandelten SOD1*G93A Versuchsgruppe (RD2RD2-behandelt: 104 Tage und Placebo-behandelt: 101,5 Tage) (Manuskript Kapitel 3.1). Durchschnittlich lag der Zeitpunkt der zwei Behandlungsgruppen in der 14. Woche und damit zum einen zwei Wochen nach dem Start der i.p. Therapiestudie und zum anderen zwei Wochen vor dem berechneten Zeitpunkt „Krankheitsbeginn“ in der Pilotstudie. Die Erfahrung aus der Pilotstudie, die wöchentlichen Verhaltenstests (Spreizreflextest) und die engmaschigere Begutachtung der Tiere per Beurteilungsbogen führte zu einer exakteren Eingrenzung des Zeitpunktes „Krankheitsbeginn“ als der bestimmte Zeitpunkt in der Pilotstudie, welcher der Literatur entsprach (Pfohl et al., 2015, Hayworth and Gonzalez-Lima, 2009).

In der zweiten präventiven Therapiestudie wurden die transgenen SOD1*G93A Mäuse und nicht-transgene Geschwistertiere täglich p.o. mit RD2RD2 oder Placebo (Trinkwasser)

behandelt (Manuskript Kapitel 3.2), die in speziell angefertigten Gelatinedrops formuliert wurden (Schemmert et al., 2019b). Die orale Behandlung wurde aufgrund verschiedener vorteilhafter Gründe als Verabreichungsform gewählt, die lauten: Die Applikation von Arzneimitteln findet üblicherweise in oraler Form statt, es ist die am wenigsten invasive Applikationsform der Arzneimittelgabe bei Patienten und bringt in der Langzeitanwendung die höchste Therapietreue mit sich. Des Weiteren war die Behandlungsdauer mit RD2RD2 in der präventiven i.p. Therapiestudie durch die begrenzte Nutzungszeit der osmotischen Minipumpe auf 28 Tagen limitiert. Das Ziel dieser präventiven Therapiestudie war es einerseits, das therapeutische Potential von RD2RD2 auf die ALS Pathogenese nach oraler Verabreichung zu untersuchen und andererseits, die therapeutische Wirkung von RD2RD2 zu evaluieren, wenn der Behandlungszeitraum verlängert wird. In einigen SOD1*G93A Therapiestudien mit entzündungshemmenden Substanzen ist publiziert, dass ein Behandlungsstart, der deutlich vor dem Auftreten erster klinischer Symptome stattfand, einen signifikanten Effekt auf die Neuroinflammation und die Krankheitsprogression in transgenen SOD1*G93A Mäusen gezeigt hat (Keller et al., 2011, Patel et al., 2015, Apolloni et al., 2016). Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse aus der i.p. Therapiestudie entschieden wir uns dafür die Behandlung in der p.o. Therapiestudie früher zu starten. Der Behandlungsbeginn lag aus diesem Grund bei einem Durchschnittsalter der Mäuse von sieben Wochen und somit fünf Wochen vor Behandlungsbeginn der präventiven i.p. Therapiestudie.

In der p.o. Therapiestudie konnten eine erhöhte *in vivo* Wirksamkeit von RD2RD2 entgegen der i.p. Therapiestudie nachgewiesen werden. Placebo-behandelte, transgene SOD1*G93A Mäuse zeigten ein signifikantes Fortschreiten des neurodegenerativen Phänotyps verglichen mit RD2RD2-behandelten, transgenen Mäusen (Manuskript Kapitel 3.2). Die Ergebnisse des SHIRPA-Tests und der zusätzlichen motorischen Tests (modifizierte Stabtest, Greifstärke- und der Spreizreflextest der Hinterbeine) zeigten eine signifikant verlangsamte Progression des motorisch-neurodegenerativen Phänotyps von RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen, insbesondere in den ersten Behandlungswochen. Die RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse nahmen während des Versuchszeitraumes relativ mehr an Gewicht zu als die mit Placebo-behandelten, transgenen Geschwistertiere (Manuskript Kapitel 3.2). Im Durchschnitt wogen die beiden transgenen SOD1*G93A Versuchsgruppen weniger als die nicht-transgenen Geschwistertiere (Daten unpubliziert). Zur Beurteilung der Krankheitsprogression und des Zeitpunktes "Krankheitsbeginn" wurden die transgenen SOD1*G93A Tiere mindestens dreimal pro Woche nach den Kriterien von Mead et al. (2011) auf den Verlust des Spreizreflexes und dem gleichzeitigen Auftreten eines Tremors in den Hinterbeinen

untersucht (Mead et al., 2011) (Manuskript Kapitel 3.2). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der verschiedenen Verhaltensanalysen verzögerte die orale RD2RD2-Behandlung den Krankheitsausbruch im transgenen SOD1*G93A Mausmodell signifikant.

Es konnte gezeigt werden, dass die orale Verabreichung von 50 mg/kg RD2RD2 ausreichend ist, um einen therapeutischen Effekt im transgenen SOD1*G93A Mausmodell zu erreichen. Verglichen mit der i.p. Therapiestudie konnte festgestellt werden, dass eine frühere RD2RD2 Behandlung im transgenen SOD1*G93A Mausmodell die phänotypische ALS Symptomatik effektiv verzögert, wie zuvor von anderen Forschergruppen publiziert (Keller et al., 2011, Patel et al., 2015, Apolloni et al., 2016). Die nicht-transgenen Geschwistertiere zeigten während der beiden präventiven Therapiestudien ein normales, wildtypisches Verhalten und keine Defizite in der motorischen Leistung.

Immunhistochemische Quantifizierungen

Neben den klinischen Symptomen ist die Neuroinflammation ein prominentes pathologisches Merkmal der ALS. In der frühen Phase der Erkrankung erzeugen aktivierte Gliazellen eine schützende Immunantwort, während im weiteren Verlauf der Erkrankung eine übermäßige Gliazellreaktion schädlich ist und zu einer neurotoxischen Reaktion führt (Beers et al., 2006, Hooten et al., 2015). Die Aktivierung von Gliazellen führt zu Veränderungen in der Produktion und Freisetzung von Entzündungsmarkern (Evans et al., 2013, Becher et al., 2017, Mammana et al., 2018), wodurch die Krankheitsprogression fortschreitet. Als Reaktion auf die Krankheitsprogression verändern z.B. Astrozyten ihre Morphologie und Funktion. Dieser Prozess umfasst umfangreiche, molekulare Veränderungen, die zur Hypertrophie und Proliferation der Astrozyten führt (Kushner et al., 1991, Levine et al., 1999, Díaz-Amarilla et al., 2011). Mikroglia sind wie Astrozyten primäre Immunzellen des zentralen Nervensystems, die als Reaktion der Krankheitsprogression aktiviert werden, wobei die Zellen abgestufte und zeitliche Veränderungen in ihrer Morphologie und Genexpression durchlaufen (Henkel et al., 2009, Ohgomori et al., 2016). Zur Validierung der Ergebnisse aus den Verhaltensversuchen der präventiven i.p. Therapiestudie wurde in einer histologischen Untersuchung bei allen Mäusen die Aktivierung von Entzündungsmarkern (Astrozyten und Mikroglia) im Hirnstamm sowie die neuronale Dichte im motorischen Kortex untersucht (Manuskript Kapitel 3.1). Weiterhin analysierten wir Gewebeschnitte des lumbalen Rückenmarks, in dem die motorischen Bahnen aus dem Gehirn zu den Hintergliedmaßen verlaufen. Für die pathologische Analyse wurde die Anzahl der aktivierten Gliazellen und die Anzahl der Neuronen durch immunhistochemische Färbung bestimmt und quantifiziert. Die RD2RD2-Behandlung führte im transgenen SOD1*G93A Mausmodell zu einer Verringerung der Gliose im Hirnstamm

und im lumbalen Rückenmark verglichen mit Placebo-behandelten, transgenen Geschwistertieren (Manuskript Kapitel 3.1), was darauf hindeutet, dass die RD2RD2-Behandlung die Neuroinflammation effizient reduziert.

Weiterhin untersuchten wir die Dichte der Neurone im motorischen Kortex und im Hirnstamm. Neurone im motorischen Kortex regulieren die Kontrolle der motorischen Leistung und degenerieren selektiv während der Krankheitsprogression im transgenen SOD1*G93A Mausmodell (Fogarty et al., 2015). Die progressive Degeneration der Neurone des motorischen Kortex und des Hirnstamms führen zur Atrophie u.a. der Hinterbeinmuskulatur und somit zu Defiziten in der motorischen Leistung der Tiere. Die Analyse der neuronalen Kerne im Hirnstamm und im motorischen Kortex in Gewebeproben der transgenen SOD1*G93A Mäusen vs. der nicht-transgenen Geschwistertiere ergab einen Verlust an Neuronen analog publizierter Daten (An et al., 2014, Solomonov et al., 2016). Dennoch war die Anzahl der Neurone im motorischen Kortex und im Hirnstamm signifikant höher in RD2RD2-behandelten SOD1*G93A Mäusen als in der Placebo-behandelten transgenen Versuchsgruppe (Manuskript Kapitel 3.1). Aufgrund dieses Ergebnisses, wird ein positiver Effekt von RD2RD2 auf das neuronale Überleben im transgenen SOD1*G93A Mausmodell nicht ausgeschlossen.

Analog der ersten Therapiestudie wurden immunhistochemische Analysen von Hirn- und Rückenmarksgewebe der drei Versuchsgruppen nach der Beendigung der präventiven p.o. Therapiestudie durchgeführt (Manuskript Kapitel 3.2). Zur Beurteilung der Neuroinflammation in Abhängigkeit der phänotypischen Krankheitsprogression wurde der Hirnstamm und das lumbale Rückenmark auf die Anzahl aktivierter Mikrogliazellen und Astrozyten quantifiziert. Die immunhistochemischen Analysen ergaben eine signifikant erhöhte Gliose im Hirnstamm und lumbalen Rückenmark transgener Mäuse im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren. Jedoch war die Anzahl aktivierter Mikrogliazellen und Astrozyten im Hirnstamm der RD2RD2- vs. Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse signifikant reduzierter (Manuskript Kapitel 3.2). Die Daten der immunhistochemischen Quantifizierung korrelierten zudem signifikant mit den erhobenen Daten aus dem SHIRPA-Test zum neurodegenerativen Phänotyp in der letzten Behandlungswoche (Manuskript Kapitel 3.2). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Behandlung mit RD2RD2 einen Einfluss auf den inflammatorischen Prozess und die Aktivierung von Gliazellen im Hirnstamm transgener SOD1*G93A Mäusen hat.

Ein definierendes Merkmal der ALS-ähnlichen Symptomatik ist die fatale Progression der Neurodegeneration (Boillée et al., 2006, Lewis et al., 2014, Fogarty et al., 2015). Aufgrund der normalisierten motorischen Leistung der RD2RD2-behandelten, transgenen

SOD1*G93A Mäusen, untersuchten wir, ob die RD2RD2-Behandlung einen Effekt auf die Anzahl der Neurone hat (Manuskript Kapitel 3.2). Dazu färbten wir reife und cholinerge Neurone im Hirnstamm und im motorischen Kortex aller Mäuse nach Versuchsende an. In beiden Hirnarealen war die Anzahl der Neurone der RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse annähernd auf dem Niveau der nicht-transgenen Geschwistertiere (Manuskript Kapitel 3.2). Die Quantifizierung im Hirnstamm zeigte eine signifikante Degeneration der Neurone in Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen vs. nicht-transgener Geschwistertiere und eine signifikant fortgeschrittene Neurodegeneration im motorischen Kortex der Placebo-behandelten, transgenen Tiere (Manuskript Kapitel 3.2). Die Daten der immunhistochemischen Quantifizierung der Neurone korrelierten zudem signifikant mit den erhobenen Daten aus dem SHIRPA-Test zum neurodegenerativen Phänotyp in der letzten Behandlungswoche (Manuskript Kapitel 3.2). Ausgehend von diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass RD2RD2 im SOD1*G93A Mausmodell einen neuroprotektiven Effekt hat.

Zusammenfassend wurde in den präventiven Therapiestudien gezeigt, dass die Behandlung mit RD2RD2 im transgenen SOD1*G93A Mausmodell zu einer Reduktion aktivierter Gliazellen im Rückenmark und Hirnstamm führte, sowie zur Neuroprotektion der reifen und cholinergen Neurone im Gehirn.

Biochemische Analyse

Zusätzlich zu den immunohistochemischen Quantifizierungen der Gliazellen der präventiven p.o. Therapiestudie wurde ein Multiplex-Immunoassay durchgeführt unter der Fragestellung, ob die Behandlung mit RD2RD2 einen antiinflammatorischen Effekt auf Entzündungsmarker wie Zytokine und Chemokine im Plasma behandelter, transgener SOD1*G93A Mäusen hat. Hierfür wurden Plasmaproben am Versuchsende extrahiert, wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben. Die Messung wurde am Deutsches Diabetes-Zentrum (DDZ) des Leibniz-Zentrum für Diabetes-Forschung an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf von Dr. Sonja Hartwig durchgeführt. Nicht alle Proben konnten im Multiplex-Immunoassay aufgrund einer limitierenden Probenanzahl des Assays gemessen werden. Die Daten wurden nach Herstellerangabe ausgewertet, was bedeutet, dass alle Werte unterhalb der Nachweisgrenze von der Analyse ausgeschlossen wurden.

Die Behandlung mit RD2RD2 führte zu einer Normalisierung einiger Entzündungsmarker (Interleukine: IL-1 β , IL-6, IL-10 und Chemokin: CCL-2) im Plasma der transgenen SOD1*G93A Mäuse verglichen mit den gemessenen Konzentrationen im Plasma der nicht-transgenen Geschwistertiere (Manuskript Kapitel 3.2). Die Analyse ergab des Weiteren eine signifikante Erhöhung bzw. Reduzierung mehrerer Zytokine und Chemokine (IL-1 β , IL-6,

IL-10, IL-12p40, IL-13, IL-17, CCL-2 und CXCL-1) in Plasmaproben von Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen vs. nicht-transgenen Geschwistertieren. Die Messung der Interleukine 10 und 13 und des Chemokins CCL-2 ergab zu dem einen signifikant erhöhten Wert im Plasma von RD2RD2- vs. Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse.

Sowohl in ALS Patienten, als auch im transgenen SOD1 Mausmodell spielen Entzündungsmarker, wie Zytokine, eine Rolle in der Pathogenese der ALS (Elliott, 2001, Beers et al., 2011a, Prado et al., 2018). Abhängig von einem komplexen Zusammenspiel zwischen verschiedenen Immunzellen und Mediatoren, wirken die Entzündungsmarker je nach Stadium der Krankheitsprogression toxisch oder neuroprotektiv (Elliott, 2001, Jeyachandran et al., 2015). Zudem ist die Induktion der Zytokine im zentralen Nervensystem weitgehend von der Aktivierung der Gliazellen abhängig (Boillée et al., 2006, Hensley et al., 2006, Haidet-Phillips et al., 2011). Ein wichtiges Zytokin ist das bifunktionale IL-6, was sowohl als proinflammatorischer Botenstoff (Scheller et al., 2011), als auch als antiinflammatorisches Myokin (Pedersen and Febbraio, 2008) in physiologischen Prozessen fungiert. In transgenen Mäusen mit mutierten SOD1*G93A setzen aktivierte Mikrogliazellen TNF- α frei (Weydt et al., 2004), das die Produktion von IL-6 in Astrozyten- und Mikrogliazellen stimuliert, was im zentralen Nervensystem zu einer reaktiven Gliose führt (Gruol and Nelson, 1997). Die Reduktion der neuroinflammatorischen Gliazellexpression im Gehirn der RD2RD2- vs. Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse und die Ergebnisse der Zytokinmessung geben diesen Zusammenhang wieder.

Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte folgendes mit bedacht werden: Es ist möglich, dass die Zytokinlevel der Mäuse durch induzierten körperlichen Stress vor der Gewinnung der Plasmaproben beeinflusst wurden. In einem Experiment von *Cheng et al.* (2015) wird gezeigt, dass sich durch induzierten Belastungsstress die Zytokinlevel im Plasma von C57BL/6 Mäusen erhöhen (Cheng et al., 2015). Durch die kurzzeitige Inhalationsnarkose (max. 2-3 min) vor der finalen Herzpunktion der nicht-transgenen Tiere, sowie die max. 60-minütige Inhalationsnarkose inkl. PET-Messung der transgenen SOD1*G93A Mäuse, haben die Tiere ein erhöhtes Stresslevel erfahren als nicht-transgene Tiere, die direkt zur Organentnahme finalisiert werden. Der Stressfaktor der nicht-transgenen und transgenen Tiere könnte zudem unterschiedlich stark gestiegen sein, aufgrund der unterschiedlichen Zeit, die die Tiere in der Narkose verbrachten, sowie der Applizierungen des PET-Tracers.

Zusammenfassung der präventiven Therapiestudie

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die präventive Behandlung mit RD2RD2 im transgenen SOD1*G93A Mausmodell therapeutische Wirksamkeit zeigt. Die Behandlung mit RD2RD2 stoppte das Fortschreiten des Phänotyps der transgenen SOD1*G93A Mäuse ab Behandlungsbeginn und es kam währenddessen zu keiner signifikanten Progression des neurodegenerativen Phänotyps. In den RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen kam es zu einer Reduktion der aktivierten Gliazellen im Hirnstamm und im lumbalen Rückenmark. Die Analysen der Neuronen in verschiedenen Gehirnarealen zeigten eine neuroprotektive Funktion in den RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Tieren.

Die Behandlungsdauer in den präventiven Therapiestudien wurde durch behördliche Vorschriften auf den Zeitpunkt vor dem Einsetzen der schwerwiegenden Symptomatik in den transgenen SOD1*G93A Mäusen eingeschränkt, der durch den Zeitpunkt "Krankheitsbeginn" (16 Wochen) in der Pilotstudie definiert wurde. Aus diesem Grund, konnte vorerst keine Aussage zum Behandlungseffekt von RD2RD2 auf transgene SOD1*G93A Mäuse über diesen Zeitpunkt hinaus getroffen werden. Nachdem die Wirksamkeit von RD2RD2 im transgenen SOD1*G93A Mausmodell nachgewiesen wurde, durfte eine kurative Therapiestudie (Überlebensstudie) durchgeführt werden, d.h. die RD2RD2-Behandlung von transgenen SOD1*G93A Mäuse wurde über das Alter von 16 Lebenswochen weitergeführt bis zum Erreichen definierter Abbruchkriterien (Kapitel 4.1.2).

5.3 Kurative Therapiestudie

Behandlungseffekte nach oraler Applikation von L-RD2RD2

Basierend auf den Erkenntnissen der durchgeführten präventiven RD2RD2 Behandlungsstudien im SOD1*G93A Mausmodell, sollte in einem nächsten Schritt das therapeutische Potential von RD2RD2 in einer kurativen p.o. Studie untersucht und validiert werden. Für die kurative Behandlungsstudie wurde erneut die orale Verabreichung gewählt, da dies die bevorzugte Applikationsmethode beim Menschen ist. Um zu untersuchen, ob RD2RD2 einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und das Überleben hat, wurden die transgenen SOD1*G93A Mäusen täglich mit 50 mg/kg Peptid- oder Placebo-Geleedrops gefüttert. Um unerwünschte Nebenwirkungen bei Wildtyp-Mäusen auszuschließen, wurde eine Gruppe von nicht-transgenen Geschwistertieren mit einer äquivalenten Dosis an Peptid behandelt. Die Behandlung der transgenen SOD1*G93A Mäusen wurde bis zum Erreichen definierter Abbruchkriterien durchgeführt (Kapitel 4.1.2), während die Behandlung der nicht-transgenen Gruppen eine Woche länger durchgeführt wurde. Wie in der Stellungnahme (Kapitel 4.1.1) erklärt, kam es aufgrund einer Fehllieferung des Peptidherstellers zur Applikation von L-RD2RD2, anstelle der D-Form wie in den vorherigen präventiven Therapiestudien.

Verhaltenstests

Die beiden nicht-transgenen Gruppen zeigten während des gesamten Versuchszeitraums ein normales Wildtyp-Verhalten und eine normale motorische Leistung. Die L-RD2RD2-Behandlung der nicht-transgenen Mäuse hatte keine Auswirkungen auf das Verhalten oder die motorische Leistung der Tiere. Über den gesamten Behandlungszeitraum gab es keine signifikanten Gewichts- und Verhaltensunterschiede zwischen den L-RD2RD2- vs. Placebo behandelten, nicht-transgenen Mäusen, oder Anzeichen von Unwohlsein oder gesundheitlichen Defizite in der Gruppe der L-RD2RD2-behandelten, nicht-transgenen Mäuse. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Behandlung mit L-RD2RD2 in gesunden Tieren keine Nebenwirkungen verursachte.

Die mit Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse zeigten über den gesamten Versuchszeitraum eine signifikante Progression des neurodegenerativen Phänotyps im SHIRPA-Test, während die L-RD2RD2-Behandlung im transgenen SOD1*G93A Mausmodell zu einer langsameren Progression des Phänotyps führte. Vorallem in den ersten drei Therapiewochen bewirkte die Behandlung mit L-RD2RD2 eine zeitliche Verschiebung der phänotypischen Ausprägung in transgenen SOD1*G93A Mäusen, die bis zum letzten Versuchstag detektiert wurde. Darüber hinaus waren die lokomotorische

Aktivität und das spontane Explorationsverhalten der mit L-RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse im Offenfeldtest nach zehn Wochen Behandlung auf dem Niveau der nicht-transgenen Mäuse. Die Untersuchung der motorischen Defizite in den verschiedenen Verhaltenstests (Rotarod-Test, modifizierten Stabtest, Greifstärke- und Spreizreflextest) ergab, dass die motorische Leistung der Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse ab der Basismessung (Behandlungswoche 0) wöchentlich defizitärer wurde, während eine signifikante Verzögerung der motorischen Defizite von L-RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen gemessen wurde. Nach der dritten Behandlungswoche wurde wie in der Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Versuchsgruppe ein stetiger Anstieg der phänotypischen Progression und der motorischen Defizite in der mit L-RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Gruppe detektiert, der ab diesem Zeitpunkt signifikant wurde im Vergleich zur Versuchsgruppe L-RD2RD2-behandelter, nicht-transgener Mäusen. Dennoch war der neurodegenerative Phänotyp und die motorische Leistung der L-RD2RD2- vs. Placebo-behandelten SOD1*G93A Mäusen bis zum Ende der Verhaltensexperimente signifikant geringer ausgeprägt.

Die Ergebnisse der Verhaltenstests von den L-RD2RD2- vs. Placebo-behandelten SOD1*G93A Mäusen aus den ersten Wochen zeigen, dass L-RD2RD2 zum Therapiebeginn eine geringfügige therapeutische Wirksamkeit im SOD1*G93A Mausmodell hat, was zu einer Verschiebung der Ausprägung der phänotypischen Defizite L-RD2RD2-behandelter, transgener SOD1*G93A Mäuse führte. In unserem Labor werden L-Peptide standardmäßig zur Kontrolle in *in vitro* Versuchen, wie z.B. bei der Überprüfung der proteolytischen Stabilität neu entwickelter D-Peptide in Körperflüssigkeiten (Magen-Darmsaft) eingesetzt (Elfgen et al., 2017, Elfgen et al., 2019). Innerhalb weniger Minuten sind die L-Peptide proteolytisch abgebaut und nicht mehr detektierbar. Aus dieser Erfahrung wird geschlussfolgert, dass L-RD2RD2 im Darm sehr schnell abgebaut wurde und daher die therapeutische Wirksamkeit von L-RD2RD2 von Beginn an limitiert war. Den therapeutischen Effekt von L-RD2RD2 im transgenen SOD1*G93A Mausmodell, der vor allem in den ersten drei Behandlungswochen detektiert wurde, führen wir darauf zurück, dass die Progression des motorisch-neurodegenerativen Phänotyps in den transgenen Tieren zu Behandlungsbeginn noch nicht soweit fortgeschritten war, sodass L-RD2RD2 eine geringfügige therapeutische Wirksamkeit erzielen konnte. Die Vermutung wird dahingehend unterstützt, dass der therapeutische Effekt von L-RD2RD2 ab der dritten Behandlungswoche (Tiere 13 bis 14 Wochen alt) keine weitere Verlangsamung des neurodegenerativen Phänotyps in L-RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen induzierte, sondern nur die reduzierte defizitäre Leistung aus den ersten zwei

Behandlungswochen gegenüber den Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Geschwistertieren aufrechterhielt. Des Weiteren unterstützen die Analysen zum Zeitpunkt „Krankheitsbeginn“ und zur Überlebenszeit diese Annahme. Obwohl die Behandlung mit L-RD2RD2 den Krankheitsausbruch in der transgenen SOD1*G93A Gruppe signifikant verzögerte, wurde keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit erzielt. Zur (primären) Analyse, ob die Behandlung mit L-RD2RD2 einen Effekt auf das Überleben von transgenen SOD1*G93A Mäusen hat, sowie ob L-RD2RD2 (sekundär) einen Einfluss auf nicht-transgene Mäuse hat, wurden alle Tiere nach den letzten Verhaltensexperimenten weiter mit L-RD2RD2-behandelt und intensiv beobachtet. Alle Mäuse der beiden transgenen Gruppen erreichten die Abbruchkriterien bis zu vier Wochen nach den letzten Verhaltensexperimenten. L-RD2RD2- und Placebo-behandelte, nicht-transgene Geschwistertiere lebten während und nach dem Ende der Verhaltenstests ohne jegliche Nebenwirkung. Zur Kontrolle für die immunhistochemischen Quantifizierungen wurden die nicht-transgenen Mäuse eine Woche nachdem die letzte transgene Maus die Abbruchkriterien erreicht hatte, getötet.

Immunohistochemische Quantifizierung

Die anschließende immunhistochemische Analyse bestätigte die Ergebnisse der primären und motorischen Verhaltenstests. Die Analyse von Gliazellen und Neuronen im Gehirn zeigte keine signifikante Veränderung der Neuroinflammation oder des Überlebens der Neuronen in den L-RD2RD2- vs. Placebo-behandelten SOD1*G93A Gruppen (Kapitel 4.2.2.3). Die Gliose und die Neurodegeneration waren in beiden transgenen SOD1*G93A Behandlungsgruppen gegenüber den nicht-transgenen Geschwistertieren signifikant fortgeschritten. Die nicht-transgenen Gruppen wiesen ein äquivalentes Level an aktivierten Gliazellen und Neuronen auf Wildtypniveau auf, was bestätigt, dass L-RD2RD2 keinen negativen Einfluss auf molekularer Ebene hat.

Zusammenfassung der kurativen p.o. Therapiestudie mit L-RD2RD2

Aus den Ergebnissen der Verhaltenstests lässt sich schließen, dass L-RD2RD2 ein geringfügiges therapeutisches Potential besitzt, was durch die signifikante Verzögerung des neurodegenerativen Phänotyps und der motorischen Defizite zu Behandlungsbeginn belegt wird. L-RD2RD2 ist u.a. aus insgesamt 10 Argininresten aufgebaut. Die Methylierung von Arginin spielt eine wichtige Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen, die mit der Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen einhergehen (Basso and Pennuto, 2015). Eine signifikante metabolische Störung der Konzentration an Arginin wurde während der Progression der Krankheit im Plasma von ALS Mäusen und in ALS Patienten festgestellt (Patin et al., 2017, Ikenaka et al., 2019). Lee et al. (2009) zeigten, dass die tägliche orale

Aufnahme von L-Arginin über das Trinkwasser im transgenen SOD1*G93A Mausmodell dem Verlust von cholinergen Motoneuronen im lumbalen Rückenmark vorbeugte, den Krankheitsbeginn verzögerte und die Überlebenszeit verlängerte (Lee et al., 2009). Die Autoren schlussfolgern, dass L-Arginin die motorischen Neurone vor Glutamat-induzierter Toxizität *in vivo* schützt, der Mechanismus, der diesem Effekt zugrunde liegt, aber nicht bekannt ist. In der Studie von Lee et al. (2009) wurden transgene SOD1*G93A Mäuse mit einer 6 %-igen L-Arginin Trinkwasserlösung zweimal täglich behandelt (Lee et al., 2009), was *per se* einer höheren Konzentration an L-Arginin pro Tag entspricht als der L-Arginin Konzentration, die durch den proteolytischen Abbau von L-RD2RD2 dem Mausorganismus zur Verfügung gestellt wurde. Die Daten zeigen, dass mit der Progression des motorisch-neurodegenerativen Phänotyps der Behandlungseffekt von L-RD2RD2 im SOD1*G93A Mausmodell verloren geht. Es lässt sich schlussfolgern, dass aufgrund der geringen proteolytische Stabilität des L-Peptids die Konzentration an L-Arginin nicht ausreichend ist, um einen wirksamen Effekt im transgenen SOD1*G93A Mausmodell zu erzielen. Dass es in der histologischen Analyse keinen Unterschied in den neuroinflammatorischen Level der zwei transgenen SOD1*G93A Behandlungsgruppen gibt, liegt des Weiteren daran, dass die transgenen SOD1*G93A Mäuse alle im selben Phänotyp-Stadium getötet wurden, d.h. bei Erreichen der Abbruchkriterien. Wären die transgenen Tiere in einer Querschnittsstudie zum selben Zeitpunkt getötet worden, hätte sich evtl. ein Effekt auf die Neuroinflammation quantifizieren lassen.

5.4 Fazit und Ausblick

Neuroinflammation und inflammatorische Prozesse sind prominente pathologische Merkmale der ALS und treten sowohl bei Patienten, als auch in dem ALS-spezifischen SOD1*G93A Mausmodell auf (Weydt and Möller, 2005, Philips and Robberecht, 2011, Robberecht and Philips, 2013, Jara et al., 2017). In dieser Arbeit wurde das antiinflammatorische Potential von RD2RD2 in mehreren Therapiestudien indem für Entzündungsreaktionen charakterisierten ALS-spezifischen SOD1*G93A Mausmodell evaluiert.

Die Behandlung mit RD2RD2 verlangsamte die Progression des neurodegenerativen Phänotyps im transgenen SOD1*G93A Mausmodell, führte zu einer Reduktion der inflammatorischen Reaktionen und verringerte die Neurodegeneration. Zudem wurde gezeigt, dass ein früherer Behandlungsstart mit RD2RD2 (präventive p.o. Therapiestudie) gegenüber dem zeitlichen Therapiestart der präventiven i.p. Studie, die therapeutische Wirksamkeit von RD2RD2 auf die Neuroinflammation im transgenen SOD1*G93A Mausmodell effizient erhöhte. Unsere Beobachtungen stimmen mit publizierten Daten verschiedener Forschungsgruppen überein, die einen zeitabhängigen Effekt von entzündungshemmenden Substanzen auf die Neuroinflammation und die Krankheitsprogression in transgenen SOD1*G93A Mäusen zeigen (Keller et al., 2011, Patel et al., 2015, Apolloni et al., 2016), wenn die Behandlung in einer frühen Phase der ALS beginnt. Obwohl die Neuroinflammation nicht *per se* die ALS auslöst, sind aktivierte Gliazellen des Zentralnervensystems sowie Immunzellen der Peripherie, einschließlich der von ihnen freigesetzten immunmodulierenden Zytokine, Treiber der Krankheitsprogression (Hall et al., 1998, Yamanaka et al., 2008, Zhao et al., 2013, Hooten et al., 2015). Die in gesunden Tieren stattfindenden neuroprotektiven Reaktionen von Gliazellen des Immunsystems gegen z.B. Entzündungen, wandeln sich im frühen Erkrankungsstadium in transgenen SOD1*G93A Mäusen in eine neurotoxische Reaktion um, die die inflammatorische Antwort beschleunigt (Henkel et al., 2009, Zhao et al., 2013). Sowohl aktivierte Mikroglia, als auch Astrozyten üben diesen neurotoxischen Effekt aus (Yamanaka et al., 2008, Liu et al., 2020). Die erzielte Reduktion der inflammatorischen Reaktionen in RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen könnte eine direkte Wirkung von RD2RD2 auf neuroinflammatorische Zellen sein und die therapeutische Wirksamkeit von RD2RD2 (auch in der AD Therapiestudie) erklären. Andererseits könnte die Reduktion der inflammatorischen Reaktionen und die Neuroprotektion in RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäuse auf eine indirekte Wirkung von RD2RD2 basieren, die die Neurone vor der Degeneration schützt, was zu einer geringeren neuroinflammatorischen

Reaktion im transgenen SOD1*G93A Mausmodell führt oder die inflammatorischen Reaktionen hemmt, wodurch es zu einer geringeren Neurodegeneration im transgenen SOD1*G93A Mausmodell kommt. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen müssen daher in Zukunft genauer untersucht werden.

Der genaue Wirkmechanismus und das direkte Target von RD2RD2 sind zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt. Es kann weder ein Off-target-Effekt von RD2RD2 auf ein bisher unbekanntes Ziel, noch die Wirkung von RD2RD2 auf das periphere Immunsystem ausgeschlossen werden, was wiederum systemisch die Entzündung abschwächen könnte. In einer doppelt transgenen Mauslinie, die humanes SOD1*G93A und humanes APP-C100 überexprimiert, wurde gezeigt, dass die gesteigerte Expression von A β den Beginn der motorischen Symptomatik beschleunigt und mit der Aggregation von SOD1*G93A assoziiert ist (Li et al., 2006). Da RD2RD2 für die direkte Zerlegung von A β Peptid Oligomeren in Monomere entwickelt wurde, wäre eine Hypothese, dass RD2RD2 über seinen ursprünglichen Wirkmechanismus wirkt. Der beschriebene Zusammenhang zwischen SOD1 und A β wurde jedoch nur in Mäusen gezeigt, die beide menschlichen Proteine überexprimieren. Die Mäuse in unseren Studien überexprimieren nur die mutierte Version vom humanen SOD1*G93A Protein und haben endogenes murines A β , das nicht in der Lage ist Aggregate zu bilden (Jankowsky et al., 2007), die neurotoxisch wirken und eine inflammatorische Immunantwort in der AD Pathogenese induzieren (Miao et al., 2005, Craft et al., 2006). Dadurch ist es äußerst unwahrscheinlich, dass das murine A β die Wirkstoff-Zielverbindung von RD2RD2 in diesem Versuchsaufbau ist, weshalb ein A β -bezogener Wirkmechanismus für RD2RD2 ausgeschlossen wird.

RD2RD2 kann aufgrund der 10 Argininreste der Klasse der kationisch zellpenetrierenden Peptide (CPP; engl. *cell-penetrating peptide*, oder PTD; engl. *protein transduction domain*, Transduktionsdomäne) zugeordnet werden. CPP weisen antiinflammatorische und neuroprotektive Eigenschaften nach traumatischen Hirnverletzungen und Schlaganfällen auf (Chiu et al., 2016, Chiu et al., 2019). In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese aufgestellt, dass die neuroprotektive Wirkung von CPP durch die Internalisierung von neuronalen Zelloberflächenstrukturen, wie Transportern oder Ionenkanälen, infolge von Endozytose vermittelt wird, was z. B. zu einer Verringerung des Kalziumioneneinstroms führt, der mit Exzitotoxizität und anderen Rezeptor vermittelten Neurotoxizitäts-induzierenden Signalwegen assoziiert ist (Meloni et al., 2015). Es wird weiter angenommen, dass CPP nach der Internalisierung auf andere Targets, wie die Proproteinkonvertasen (PC; engl. *Proprotein convertase*), wirken. Fugere et al. (2007) zeigten, dass einige Arginin-Polypeptide potente Inhibitoren der PC des konstitutiven sekretorischen Weges (PC5/6, PC7 und Furin) sind (Fugere et al., 2007). Furin, ein integrales Transmembranprotein, ist

eine ubiquitär vorkommende PC, dass die proteolytische Reifung von Vorläufer-Proteinen katalysiert (Nakayama, 1997). *Yamada et al.* (2018) zeigten für zwei Furin Inhibitoren, dass die Hemmung von Furin vor neuronalem Zelltod schützt, der durch aktivierte NMDA Rezeptoren induziert wird (Yamada et al., 2018). Aufgrund des in den motorischen Verhaltenstests und der Quantifizierung festgestellten neuroprotektiven Effekts in RD2RD2-behandelten, transgenen SOD1*G93A Mäusen, wird eine Wirkung von RD2RD2 auf PC zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen.

Andere hypothetische Targets von RD2RD2 könnten purinerge Rezeptoren, wie der ionotrope P2X- und der metabotrope P2Y-Rezeptor sein. Degenerierende bzw. abnormal funktionierenden Neuronen setzen ATP frei, das die P2-Rezeptoren aktiviert. Die ATP-gesteuerten P2-Rezeptoren induzieren die Aktivierung von Mikroglia (Skaper et al., 2010), die eine Schlüsselrolle in den neuroinflammatorischen Prozessen spielen. Es zeigte sich zum Beispiel, dass die P2X₇-Rezeptor-Isoform auf Gliazellen lokalisiert ist (Yiangou et al., 2006, D'Ambrosi et al., 2009). Die Aktivierung des P2X₇-Rezeptors führt zu einem Entzündungsreiz proinflammatorischer Zytokine, wie dem IL-1 β , einem Schlüsselmolekül bei der Neurodegeneration (Ferrari et al., 1997, Allan and Rothwell, 2001). Ein Funktionsverlust des P2X₇-Rezeptors in C57BL/6-J Mäusen resultierte in einer substantiell abgeschwächten Entzündungsreaktion (Miller et al., 2011). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Rezeptors mit einem Antagonisten zu einer deutlichen Reduzierung des neurodegenerativen Phänotyps in SOD1*G93A Mäusen führt (Ruiz-Ruiz et al., 2020). Eine unspezifische Bindung von RD2RD2 an den purinergen P2X-Rezeptor kann ebenfalls eine mögliche Erklärung für unsere Ergebnisse sein.

In zukünftigen Studien sollte untersucht werden, wie RD2RD2 die Pathogenese der ALS und die neuroinflammatorischen Prozesse beeinflusst. Ein Anfang ist die Charakterisierung der pharmakokinetischen Eigenschaften von RD2RD2. Für das transgene SOD1*G93A Mausmodell ist publiziert, dass die Durchlässigkeit der BHS im Hirnstamm mit Ausbruch der ALS-ähnlichen Symptomatik (ab einem Alter von 13 Wochen) im Vergleich zu nicht-transgenen (C57BL/6J) Mäusen beeinträchtigt ist (Garbuzova-Davis et al., 2007a, Garbuzova-Davis et al., 2007b). *Garbuzova-Davis et al.* (2007) zeigten, dass die Integrität der BHS von transgenen SOD1*G93A Mäusen schon ab den ersten sichtbaren Symptomen (definiert als: Tremor und reduzierte/partielle Streckung der Hintergliedmaßen) verändert ist (Garbuzova-Davis et al., 2007a). Durch die Degeneration von Endothelzellen zusammen mit der Degeneration von Astrozyten kommt es zu einer Beeinträchtigung der BHS, was zu einer vaskulären Durchlässigkeit der BHS führt (Garbuzova-Davis et al., 2007a). Hierauf basierend und den evaluierten Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass RD2RD2 über die BHS ins Gehirn transportiert wurde. Um dies zu beweisen, muss ein

pharmakokinetische Profil von RD2RD2 erstellt werden. Daher werden wir *in vitro* die Stabilität von RD2RD2 in verschiedenen Medien (z.B. Plasma, gastrointestinale Flüssigkeiten oder Lebermikrosomen) weiter charakterisieren und *in vivo* pharmakokinetische Experimenten in Mäusen aus der hausinternen Zucht unter Betrachtung verschiedener Parameter durchführen (1.: Applikationsweg (i.v., i.p. und p.o.), 2.: geschlechtsspezifischer Unterschied (männlich vs. weiblich) und 3.: genotypspezifischer Unterschied (transgene SOD1*G93A Mäuse vs. nicht-transgene Geschwistertiere)). Im Gegensatz zu einigen anderen D-Peptiden, wie z.B. D3, RD2 oder RD2D3 (Liu et al., 2010, Jiang et al., 2015, Leithold et al., 2016b, Leithold et al., 2016a, Schartmann et al., 2018b), liegt aus methodischen Gründen bislang kein pharmakokinetisches Profil von RD2RD2, einschließlich der Fähigkeit zur Durchdringung der BHS, vor. Für z.B. RD2 konnte bereits ein pharmakokinetisches Profil erstellt werden, sowie die Überwindung über die BHS und die Aufnahme ins Gehirn von C57BL/6N Mäusen gezeigt werden (Leithold et al., 2016a, Schartmann et al., 2018b). Falls nachgewiesen werden kann, dass RD2RD2 die BHS von transgenen SOD1*G93A Mäusen und nicht-transgenen Tieren passiert, könnten in weiteren pharmakokinetischen Experimenten unter Beachtung der von *Garbuzova-Davis et al.* (2007) publizierten Erkenntnisse zur veränderten Durchlässigkeit der BHS als Folge der Krankheitsprogression, Untersuchungen dazu stattfinden, ob es in Abhängigkeit des fortschreitenden Krankheitsverlaufes zu einer Konzentrationsänderung in der Aufnahme von RD2RD2 kommt. Ein ausgiebig charakterisiertes pharmakokinetische Profil von RD2RD2 könnte dahingehend verwendet werden, um die Dosierungen von RD2RD2 in zukünftige Therapiestudien anzupassen. Des Weiteren könnten pharmakodynamische Anpassungen der Dosierungen während einer Therapiestudie in Abhängigkeit der Progression des SOD1*G93A spezifischen Phänotyps vorgenommen werden, um die Effizienz der Therapie zu steigern.

Zudem sollte die kurative p.o. Therapiestudie mit dem D-enantiomeren RD2RD2 wiederholt werden, um einen möglichen Überlebensseffekt in RD2RD2- vs. Placebo-behandelten, transgenen SOD1*G93A Geschwistertieren zu evaluieren. Weiterführend sollte der Wirkmechanismus von RD2RD2, sowie generelle inflammatorische Prozesse im transgenen SOD1*G93A Mausmodell während der Krankheitsprogression charakterisiert werden. Hierfür wäre es sinnvoll, die Entzündungsmarker (Gliazellen, Zytokine, Chemokine, u.v.m.) auf der Ebene des zentralen und peripheren Nervensystems in weiteren biochemischen Analysen (Multiplex-Immunoassay, ELISA, Western blot) zu untersuchen. Dies sollte sowohl im Plasma, als auch in verschiedenen Gewebeproben durchgeführt werden und während verschiedener Zeitpunkte der Progression des motorisch-neurodegenerativen Phänotyps, um den Behandlungseffekt mit RD2RD2

effizienter zu charakterisieren. Die in den histologischen Untersuchungen verwendeten Antikörper könnten um spezifischere Antikörper (z.B. Iba1, CD68, Phospho-p38 MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*), JAK (engl. *Janus Kinase*), STAT (engl. *Signal Transducers and Activators of Transcription*) oder ATG (engl. *autophagy-related protein*)) zur Quantifizierung aktivierter Zellen der Neuroinflammation und ergänzend der Neurodegeneration im Gehirn und Rückenmark transgener SOD1*G93A Mäuse ergänzt werden. Aus methodischen Gründen waren histologische Analysen der Motoneurone im Rückenmark bisher nicht möglich. Die Degeneration der Motoneurone im Rückenmark ist ein essentieller Bestandteil des transgenen SOD1 Mausmodells und muss daher bei zukünftigen Studien gezeigt werden. Zusätzlich könnte in Zellkulturexperimenten die BHS-Gängigkeit von RD2RD2 untersucht werden und ob D-Arginin einen neuroprotektiven Effekt auf Motoneurone hat.

Die in dieser Arbeit evaluierten Ergebnissen, verweisen auf die therapeutische Wirksamkeit von RD2RD2 im transgenen SOD1*G93A Mausmodell. Daher ist RD2RD2 ein vielversprechender Kandidat für die weitere Entwicklung und Prüfung in Richtung einer krankheitsmodifizierenden Behandlung der ALS.

Referenzen

- ABDULLA, S., VIELHABER, S., KÖRNER, S., MACHTS, J., HEINZE, H.-J., DENGLER, R. & PETRI, S. 2013. Validation of the German version of the extended ALS functional rating scale as a patient-reported outcome measure. *Journal of neurology*, 260, 2242-2255.
- ABE, K., AOKI, M., TSUJI, S., ITOYAMA, Y., SOBUE, G., TOGO, M., HAMADA, C., TANAKA, M., AKIMOTO, M. & NAKAMURA, K. 2017. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, 16, 505-512.
- ABRAMOW-NEWERLY, W., LIPINA, T., ABRAMOW-NEWERLY, M., KIM, D., BECHARD, A. R., XIE, G., CLAPCOTE, S. J. & RODER, J. C. 2006. Methods to rapidly and accurately screen a large number of ENU mutagenized mice for abnormal motor phenotypes. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 7, 112-118.
- ACEVEDO-AROEZENA, A., KALMAR, B., ESSA, S., RICKETTS, T., JOYCE, P., KENT, R., ROWE, C., PARKER, A., GRAY, A. & HAFEZPARAST, M. 2011. A comprehensive assessment of the SOD1G93A low-copy transgenic mouse, which models human amyotrophic lateral sclerosis. *Disease models & mechanisms*, 4, 686-700.
- ADESSI, C. & SOTO, C. 2002. Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Current medicinal chemistry*, 9, 963-978.
- ALEXANDER, G. M., ERWIN, K. L., BYERS, N., DEITCH, J. S., AUGELLI, B. J., BLANKENHORN, E. P. & HEIMAN-PATTERSON, T. D. 2004. Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Molecular Brain Research*, 130, 7-15.
- ALEXIANU, M. E., KOZOVSKA, M. & APPEL, S. H. 2001. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology*, 57, 1282-1289.
- ALLAN, S. M. & ROTHWELL, N. J. 2001. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 734-744.
- ALMER, G., GUÉGAN, C., TEISMANN, P., NAINI, A., ROSOKLIJA, G., HAYS, A. P., CHEN, C. & PRZEDBORSKI, S. 2001. Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 49, 176-185.
- ALMER, G., KIKUCHI, H., TEISMANN, P. & PRZEDBORSKI, S. 2006. Is prostaglandin E2 a pathogenic factor in amyotrophic lateral sclerosis? *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 59, 980-983.
- ALMER, G., TEISMANN, P., STEVIC, Z., HALASCHEK-WIENER, J., DEECKE, L., KOSTIC, V. & PRZEDBORSKI, S. 2002. Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. *Neurology*, 58, 1277-1279.

- AN, T., SHI, P., DUAN, W., ZHANG, S., YUAN, P., LI, Z., WU, D., XU, Z., LI, C. & GUO, Y. 2014. Oxidative stress and autophagic alteration in brainstem of SOD1-G93A mouse model of ALS. *Molecular neurobiology*, 49, 1435-1448.
- ANDREASSEN, O. A., DEDEOGLU, A., KLIVENYI, P., BEAL, M. F. & BUSH, A. I. 2000. N-acetyl-L-cysteine improves survival and preserves motor performance in an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*, 11, 2491-2493.
- AOKI, M., KATO, S., NAGAI, M. & ITOYAMA, Y. 2005. Development of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis expressing a human SOD1 transgene. *Neuropathology*, 25, 365-370.
- APEL, K. & HIRT, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- APOLLONI, S., AMADIO, S., MONTILLI, C., VOLONTE, C. & D'AMBROSI, N. 2013. Ablation of P2X7 receptor exacerbates gliosis and motoneuron death in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 22, 4102-4116.
- APOLLONI, S., FABBRIZIO, P., AMADIO, S. & VOLONTÉ, C. 2016. Actions of the antihistaminergic clemastine on presymptomatic SOD1-G93A mice ameliorate ALS disease progression. *Journal of neuroinflammation*, 13, 1-15.
- ARTHUR, K. C., CALVO, A., PRICE, T. R., GEIGER, J. T., CHIO, A. & TRAYNOR, B. J. 2016. Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nature communications*, 7, 1-6.
- AWANO, T., JOHNSON, G. S., WADE, C. M., KATZ, M. L., JOHNSON, G. C., TAYLOR, J. F., PERLOSKI, M., BIAGI, T., BARANOWSKA, I. & LONG, S. 2009. Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 2794-2799.
- AZARI, M. F., PROFYRIS, C., LE GRANDE, M., LOPES, E. C., HIRST, J., PETRATOS, S. & CHEEMA, S. S. 2005. Effects of intraperitoneal injection of Rofecoxib in a mouse model of ALS. *European journal of neurology*, 12, 357-364.
- AZZOUZ, M., HOTTINGER, A., PATERNA, J.-C., ZURN, A. D., AEBISCHER, P. & BÜELER, H. 2000. Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2. *Human molecular genetics*, 9, 803-811.
- AZZOUZ, M., RALPH, G. S., STORKEBAUM, E., WALMSLEY, L. E., MITROPHANOUS, K. A., KINGSMAN, S. M., CARMELIET, P. & MAZARAKIS, N. D. 2004. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature*, 429, 413-417.

- BANCI, L., BERTINI, I., BOCA, M., GIROTTI, S., MARTINELLI, M., VALENTINE, J. S. & VIERU, M. 2008. SOD1 and amyotrophic lateral sclerosis: mutations and oligomerization. *PloS one*, 3, e1677.
- BASSO, M. & PENNUTO, M. 2015. Serine phosphorylation and arginine methylation at the crossroads to neurodegeneration. *Experimental neurology*, 271, 77-83.
- BATE, S. T. & CLARK, R. A. 2014. *The design and statistical analysis of animal experiments*, Cambridge University Press.
- BECHER, B., SPATH, S. & GOVERMAN, J. 2017. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*, 17, 49-59.
- BEERS, D. R. & APPEL, S. H. 2019. Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. *Lancet Neurology*, 18, 211-220.
- BEERS, D. R., HENKEL, J. S., XIAO, Q., ZHAO, W., WANG, J., YEN, A. A., SIKLOS, L., MCKERCHER, S. R. & APPEL, S. H. 2006. Wild-type microglia extend survival in PU. 1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 16021-16026.
- BEERS, D. R., HENKEL, J. S., ZHAO, W., WANG, J., HUANG, A., WEN, S., LIAO, B. & APPEL, S. H. 2011a. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, 134, 1293-1314.
- BEERS, D. R., ZHAO, W., LIAO, B., KANO, O., WANG, J., HUANG, A., APPEL, S. H. & HENKEL, J. S. 2011b. Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical responses in ALS mice. *Brain, behavior, and immunity*, 25, 1025-1035.
- BENDOTTI, C. & CARRÌ, M. T. 2004. Lessons from models of SOD1-linked familial ALS. *Trends in molecular medicine*, 10, 393-400.
- BENJAMINSEN, E., ALSTADHAUG, K. B., GULSVIK, M., BALOCH, F. K. & ODEH, F. 2018. Amyotrophic lateral sclerosis in Nordland county, Norway, 2000-2015: prevalence, incidence, and clinical features. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 19, 522-527.
- BENSIMON, G., LACOMBLEZ, L., MEININGER, V. F. & GROUP, A. R. S. 1994. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 330, 585-591.
- BOIDO, M., PIRAS, A., VALSECCHI, V., SPIGOLON, G., MARESCHI, K., FERRERO, I., VIZZINI, A., TEMI, S., MAZZINI, L. & FAGIOLI, F. 2014. Human mesenchymal stromal cell transplantation modulates neuroinflammatory milieu in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy*, 16, 1059-1072.
- BOILLÉE, S., YAMANAKA, K., LOBSIGER, C. S., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., KASSIOTIS, G., KOLLIAS, G. & CLEVELAND, D. W. 2006. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*, 312, 1389-1392.

- BOUKAFTANE, Y., KHORIS, J., MOULARD, B., SALACHAS, F., MEININGER, V., MALAFOSSE, A., CAMU, W. & ROULEAU, G. 1998. Identification of six novel SOD1 gene mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Canadian journal of neurological sciences*, 25, 192-196.
- BOWLING, A. C., BARKOWSKI, E. E., MCKENNA-YASEK, D., SAPP, P., HORVITZ, H. R., BEAL, M. F. & BROWN JR, R. H. 1995. Superoxide dismutase concentration and activity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry*, 64, 2366-2369.
- BOYLAN, K. 2015. Familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologic clinics*, 33, 807-830.
- BRASNJEVIC, I., STEINBUSCH, H. W., SCHMITZ, C., MARTINEZ-MARTINEZ, P. & INITIATIVE, E. N. R. 2009. Delivery of peptide and protein drugs over the blood–brain barrier. *Progress in neurobiology*, 87, 212-251.
- BROOKS, B., SANJAK, M., RINGEL, S., ENGLAND, J., BRINKMANN, J., PESTRONK, A., FLORENCE, J., MITSUMOTO, H., SZIRONY, K. & WITTES, J. 1996. The amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale-Assessment of activities of daily living in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology*, 53, 141-147.
- BROOKS, B. R. 1994. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 124, 96-107.
- BROOKS, B. R., MILLER, R. G., SWASH, M. & MUNSAT, T. L. 2000. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders*, 1, 293-299.
- BROOKS, K. J., HILL, M. D., HOCKINGS, P. D. & REID, D. G. 2004. MRI detects early hindlimb muscle atrophy in Gly93Ala superoxide dismutase-1 (G93A SOD1) transgenic mice, an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In Vivo*, 17, 28-32.
- BROSNAN, J. T. & BROSNAN, M. E. 2007. Creatine: endogenous metabolite, dietary, and therapeutic supplement. *Annu. Rev. Nutr.*, 27, 241-261.
- BROWN, T. D., WHITEHEAD, K. A. & MITRAGOTRI, S. 2020. Materials for oral delivery of proteins and peptides. *Nature Reviews Materials*, 5, 127-148.
- BROWNE, E. C. & ABBOTT, B. M. 2016. Recent progress towards an effective treatment of amyotrophic lateral sclerosis using the SOD1 mouse model in a preclinical setting. *European journal of medicinal chemistry*, 121, 918-925.
- BRUIJN, L., BECHER, M., LEE, M. K., ANDERSON, K., JENKINS, N., COPELAND, N., SISODIA, S., ROTHSTEIN, J. D., BORCHELT, D. & PRICE, D. 1997. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, 18, 327-338.

- BRUIJN, L. I., MILLER, T. M. & CLEVELAND, D. W. 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 723-749.
- BRYANT, C. D., ZHANG, N. N., SOKOLOFF, G., FANSELOW, M. S., ENNES, H. S., PALMER, A. A. & MCROBERTS, J. A. 2008. Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *Journal of neurogenetics*, 22, 315-331.
- CALDEIRA, M. V., SALAZAR, I. L., CURCIO, M., CANZONIERO, L. M. & DUARTE, C. B. 2014. Role of the ubiquitin–proteasome system in brain ischemia: Friend or foe? *Progress in neurobiology*, 112, 50-69.
- CARRERA-JULIÁ, S., MORENO, M. L., BARRIOS, C., DE LA RUBIA ORTÍ, J. E. & DREHMER, E. 2020. Antioxidant alternatives in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: A comprehensive review. *Frontiers in Physiology*, 11, 63.
- CEDARBAUM, J. M. & STAMBLER, N. 1997. Performance of the amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale (ALSFRS) in multicenter clinical trials. *Journal of the neurological sciences*, 152, s1-s9.
- CEDARBAUM, J. M., STAMBLER, N., MALTA, E., FULLER, C., HILT, D., THURMOND, B., NAKANISHI, A., GROUP, B. A. S. & GROUP, A. C. L. O. T. B. S. 1999. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. *Journal of the neurological sciences*, 169, 13-21.
- CHALIFOUR, R. J., MCLAUGHLIN, R. W., LAVOIE, L., MORISSETTE, C., TREMBLAY, N., BOULÉ, M., SARAZIN, P., STÉA, D., LACOMBE, D. & TREMBLAY, P. 2003. Stereoselective interactions of peptide inhibitors with the β -amyloid peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 34874-34881.
- CHARCOT, J. 1874. De la sclérose amyotrophique latérale. *Prog Med*, 2, 325-7.
- CHARCOT, J. M. 1869. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux anterolateraux de la moelle epiniere. *Archives de Pathologie Normale et Pathologique*, 2, 744-760.
- CHENG, Y., JOPE, R. S. & BEUREL, E. 2015. A pre-conditioning stress accelerates increases in mouse plasma inflammatory cytokines induced by stress. *BMC neuroscience*, 16, 1-8.
- CHIÒ, A., CANOSA, A., GALLO, S., MOGLIA, C., ILARDI, A., CAMMAROSANO, S., PAPURELLO, D. & CALVO, A. 2012. Pain in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based controlled study. *European journal of neurology*, 19, 551-555.
- CHIU, L. S., ANDERTON, R. S., CROSS, J. L., CLARK, V. W., KNUCKEY, N. W. & MELONI, B. P. 2019. Poly-arginine peptide R18D reduces neuroinflammation and functional deficits following traumatic brain injury in the long-Evans rat. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25, 1563-1572.

- CHIU, L. S., ANDERTON, R. S., KNUCKEY, N. W. & MELONI, B. P. 2016. The neuroprotective potential of arginine-rich peptides for the acute treatment of traumatic brain injury. *Expert review of neurotherapeutics*, 16, 361-363.
- CLARK, R. A., SHOAIB, M., HEWITT, K. N., STANFORD, S. C. & BATE, S. T. 2012. A comparison of InVivoStat with other statistical software packages for analysis of data generated from animal experiments. *Journal of psychopharmacology*, 26, 1136-1142.
- CLEVELAND, D. W. & ROTHSTEIN, J. D. 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 806-819.
- COLELLA, P., RONZITTI, G. & MINGOZZI, F. 2018. Emerging issues in AAV-mediated in vivo gene therapy. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 8, 87-104.
- CORCIA, P., TAUBER, C., VERCOULLIE, J., ARLICOT, N., PRUNIER, C., PRALINE, J., NICOLAS, G., VENEL, Y., HOMMET, C. & BAULIEU, J.-L. 2012. Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PloS one*, 7, e52941.
- COURATIER, P., CORCIA, P., LAUTRETTE, G., NICOL, M., PREUX, P.-M. & MARIN, B. 2016. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a review of literature. *Revue neurologique*, 172, 37-45.
- CRAFT, J. M., WATTERSON, D. M. & VAN ELDIK, L. J. 2006. Human amyloid β -induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration. *Glia*, 53, 484-490.
- CRAIK, D. J., FAIRLIE, D. P., LIRAS, S. & PRICE, D. 2013. The future of peptide-based drugs. *Chemical biology & drug design*, 81, 136-147.
- CUDKOWICZ, M. E., VAN DEN BERG, L. H., SHEFNER, J. M., MITSUMOTO, H., MORA, J. S., LUDOLPH, A., HARDIMAN, O., BOZIK, M. E., INGERSOLL, E. W. & ARCHIBALD, D. 2013. Dexamipexole versus placebo for patients with amyotrophic lateral sclerosis (EMPOWER): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Neurology*, 12, 1059-1067.
- D'AMBROSI, N., FINOCCHI, P., APOLLONI, S., COZZOLINO, M., FERRI, A., PADOVANO, V., PIETRINI, G., CARRI, M. T. & VOLONTÉ, C. 2009. The proinflammatory action of microglial P2 receptors is enhanced in SOD1 models for amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Immunology*, 183, 4648-4656.
- DAL CANTO, M. C. & GURNEY, M. E. 1997. A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*, 93, 537-550.
- DANBOLT, N. C. 2001. Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, 65, 1-105.
- DE CARVALHO, M., DENGLE, R., EISEN, A., ENGLAND, J. D., KAJI, R., KIMURA, J., MILLS, K., MITSUMOTO, H., NODERA, H. & SHEFNER, J. 2008. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clinical neurophysiology*, 119, 497-503.

- DE GIORGIO, F., MADURO, C., FISHER, E. M. & ACEVEDO-ARZENA, A. 2019. Transgenic and physiological mouse models give insights into different aspects of amyotrophic lateral sclerosis. *Disease models & mechanisms*, 12.
- DEITCH, J. S., ALEXANDER, G. M., BENSINGER, A., YANG, S., JIANG, J. T. & HEIMAN-PATTERSON, T. D. 2014. Phenotype of Transgenic Mice Carrying a Very Low Copy Number of the Mutant Human G93A Superoxide Dismutase-1 Gene Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLOS ONE*, 9, e99879.
- DENG, H.-X., HENTATI, A., TAINER, J. A., IQBAL, Z., CAYABYAB, A., HUNG, W.-Y., GETZOFF, E. D., HU, P., HERZFELDT, B. & ROOS, R. P. 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science*, 261, 1047-1051.
- DÍAZ-AMARILLA, P., OLIVERA-BRAVO, S., TRIAS, E., CRAGNOLINI, A., MARTÍNEZ-PALMA, L., CASSINA, P., BECKMAN, J. & BARBEITO, L. 2011. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 18126-18131.
- DORST, J., LUDOLPH, A. C. & HUEBERS, A. 2017. Disease-modifying and symptomatic treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 11, 1-16.
- DOS SANTOS, N. A. G., MARTINS, N. M., DE BARROS SILVA, R., FERREIRA, R. S., SISTI, F. M. & DOS SANTOS, A. C. 2014. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects PC12 cells from MPP⁺ toxicity by inducing the expression of neuron-typical proteins. *Neurotoxicology*, 45, 131-138.
- DRACHMAN, D. B., FRANK, K., DYKES-HOBERG, M., TEISMANN, P., ALMER, G., PRZEDBORSKI, S. & ROTHSTEIN, J. D. 2002. Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 52, 771-778.
- DUNCKLEY, T., HUENTELMAN, M. J., CRAIG, D. W., PEARSON, J. V., SZELINGER, S., JOSHUPURA, K., HALPERIN, R. F., STAMPER, C., JENSEN, K. R. & LETIZIA, D. 2007. Whole-genome analysis of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *New England journal of medicine*, 357, 775-788.
- DUNKELMANN, T., SCHEMMERT, S., HONOLD, D., TEICHMANN, K., BUTZKÜVEN, E., DEMUTH, H.-U., SHAH, N. J., LANGEN, K.-J., KUTZSCHE, J., WILLBOLD, D. & WILLUWEIT, A. 2018. Comprehensive characterization of the pyroglutamate amyloid- β induced motor neurodegenerative phenotype of TBA2. 1 mice. *J. Alzheimer's Dis.*, 63, 115-130.
- DYKENS, J. A. 1994. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated CA²⁺ and Na⁺: implications for neurodegeneration. *Journal of neurochemistry*, 63, 584-591.

- ELFGEN, A., HUPERT, M., BOCHINSKY, K., TUSCHE, M., GONZÁLEZ DE SAN ROMÁN MARTIN, E., GERING, I., SACCHI, S., POLLEGIONI, L., HUESGEN, P. F., HARTMANN, R., SANTIAGO-SCHÜBEL, B., KUTZSCHE, J. & WILLBOLD, D. 2019. Metabolic resistance of the D-peptide RD2 developed for direct elimination of amyloid- β oligomers. *Scientific Reports*, 9, 5715.
- ELFGEN, A., SANTIAGO-SCHÜBEL, B., GREMER, L., KUTZSCHE, J. & WILLBOLD, D. 2017. Surprisingly high stability of the A β oligomer eliminating all-D-enantiomeric peptide D3 in media simulating the route of orally administered drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107, 203-207.
- ELLIOTT, J. L. 2001. Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Brain Research*, 95, 172-178.
- EPSTEIN, C. J., AVRAHAM, K. B., LOVETT, M., SMITH, S., ELROY-STEIN, O., ROTMAN, G., BRY, C. & GRONER, Y. 1987. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity: animal model of dosage effects in Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 8044-8048.
- EVANS, M. C., COUCH, Y., SIBSON, N. & TURNER, M. R. 2013. Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 53, 34-41.
- EVANS, M. C., SERRES, S., KHRAPITCHEV, A. A., STOLP, H. B., ANTHONY, D. C., TALBOT, K., TURNER, M. R. & SIBSON, N. R. 2014. T2-weighted MRI detects presymptomatic pathology in the SOD1 mouse model of ALS. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34, 785-793.
- FERRANTE, R. J., BROWNE, S. E., SHINOBU, L. A., BOWLING, A. C., BAIK, M. J., MACGARVEY, U., KOWALL, N. W., BROWN JR, R. H. & BEAL, M. F. 1997. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry*, 69, 2064-2074.
- FERRARI, D., CHIOZZI, P., FALZONI, S., HANAU, S. & DI VIRGILIO, F. 1997. Purinergic modulation of interleukin-1 β release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *The Journal of experimental medicine*, 185, 579-582.
- FIALA, M., CHATTOPADHAY, M., LA CAVA, A., TSE, E., LIU, G., LOURENCO, E., ESKIN, A., LIU, P. T., MAGPANTAY, L. & TSE, S. 2010. IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients. *Journal of neuroinflammation*, 7, 76.
- FILIPI, T., HERMANOVA, Z., TURECKOVA, J., VANATKO, O. & ANDEROVA, M. 2020. Glial Cells—The Strategic Targets in Amyotrophic Lateral Sclerosis Treatment. *Journal of clinical medicine*, 9, 261.
- FISCHER, L. R., CULVER, D. G., DAVIS, A. A., TENNANT, P., WANG, M., COLEMAN, M., ASRESS, S., ADALBERT, R., ALEXANDER, G. M. & GLASS, J. D. 2005. The WldS gene modestly prolongs survival in the SOD1G93A fALS mouse. *Neurobiology of disease*, 19, 293-300.

- FOGARTY, M. J., NOAKES, P. G. & BELLINGHAM, M. C. 2015. Motor cortex layer V pyramidal neurons exhibit dendritic regression, spine loss, and increased synaptic excitation in the presymptomatic hSOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience*, 35, 643-647.
- FONTANILLA, C., WEI, X., ZHAO, L., JOHNSTONE, B., PASCUZZI, R., FARLOW, M. & DU, Y. 2012. Caffeic acid phenethyl ester extends survival of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience*, 205, 185-193.
- FRAY, A. E., INCE, P. G., BANNER, S. J., MILTON, I. D., USHER, P. A., COOKSON, M. R. & SHAW, P. J. 1998. The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *European journal of neuroscience*, 10, 2481-2489.
- FRIEDLANDER, R. M., BROWN, R. H., GAGLIARDINI, V., WANG, J. & YUAN, J. 1997. Inhibition of ICE slows ALS in mice. *Nature*, 388, 31-31.
- FUGERE, M., APPEL, J., HOUGHTEN, R. A., LINDBERG, I. & DAY, R. 2007. Short polybasic peptide sequences are potent inhibitors of PC5/6 and PC7: use of positional scanning-synthetic peptide combinatorial libraries as a tool for the optimization of inhibitory sequences. *Molecular pharmacology*, 71, 323-332.
- FUNKE, S. A., VAN GROEN, T., KADISH, I., BARTNIK, D., NAGEL-STEGER, L., BRENER, O., SEHL, T., BATRA-SAFFERLING, R., MORISCOT, C. & SCHOEHN, G. 2010. Oral treatment with the D-enantiomeric peptide D3 improves the pathology and behavior of Alzheimer's disease transgenic mice. *ACS chemical neuroscience*, 1, 639-648.
- GAGGELLI, E., KOZLOWSKI, H., VALENSIN, D. & VALENSIN, G. 2006. Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chemical reviews*, 106, 1995-2044.
- GARBUZOVA-DAVIS, S., HALLER, E., SAPORTA, S., KOLOMEY, I., NICOSIA, S. V. & SANBERG, P. R. 2007a. Ultrastructure of blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS. *Brain research*, 1157, 126-137.
- GARBUZOVA-DAVIS, S., SAPORTA, S., HALLER, E., KOLOMEY, I., BENNETT, S. P., POTTER, H. & SANBERG, P. R. 2007b. Evidence of compromised blood-spinal cord barrier in early and late symptomatic SOD1 mice modeling ALS. *PloS one*, 2, e1205.
- GARBUZOVA-DAVIS, S., WILLING, A. E., MILLIKEN, M., SAPORTA, S., ZIGOVA, T., CAHILL, D. W. & SANBERG, P. R. 2002. Positive effect of transplantation of hNT neurons (NTera 2/D1 cell-line) in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental neurology*, 174, 169-180.
- GAUTIER, G., VERSCHUEREN, A., MONNIER, A., ATTARIAN, S., SALORT-CAMPANA, E. & POUGET, J. 2010. ALS with respiratory onset: clinical features and effects of non-invasive ventilation on the prognosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 11, 379-382.

- GIAMPIETRO, R., SPINELLI, F., CONTINO, M. & COLABUFO, N. A. 2018. The pivotal role of copper in neurodegeneration: a new strategy for the therapy of neurodegenerative disorders. *Molecular pharmaceutics*, 15, 808-820.
- GOLKO-PEREZ, S., AMIT, T., BAR-AM, O., YODIM, M. B. & WEINREB, O. 2017. A novel iron chelator-radical scavenger ameliorates motor dysfunction and improves life span and mitochondrial biogenesis in SOD1 G93A ALS mice. *Neurotoxicity research*, 31, 230-244.
- GOMEZ-ORELLANA, I. 2005. Strategies to improve oral drug bioavailability. *Expert opinion on drug delivery*, 2, 419-433.
- GORDON, M. N., HOLCOMB, L. A., JANTZEN, P. T., DICARLO, G., WILCOCK, D., BOYETT, K. W., CONNOR, K., MELACHRINO, J., O'CALLAGHAN, J. P. & MORGAN, D. 2002. Time course of the development of Alzheimer-like pathology in the doubly transgenic PS1+ APP mouse. *Experimental Neurology*, 173, 183-195.
- GORDON, P. H., MOORE, D. H., MILLER, R. G., FLORENCE, J. M., VERHEIJDE, J. L., DOORISH, C., HILTON, J. F., SPITALNY, G. M., MACARTHUR, R. B. & MITSUMOTO, H. 2007. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *The Lancet Neurology*, 6, 1045-1053.
- GOULD, T. D., DAO, D. T. & KOVACSICS, C. E. 2009. The open field test. *Mood and anxiety related phenotypes in mice*. Springer.
- GOULD, T. W., BUSS, R. R., VINSANT, S., PREVETTE, D., SUN, W., KNUDSON, C. M., MILLIGAN, C. E. & OPPENHEIM, R. W. 2006. Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *Journal of Neuroscience*, 26, 8774-8786.
- GRAD, L. I., GUEST, W. C., YANAI, A., POKRISHEVSKY, E., O'NEILL, M. A., GIBBS, E., SEMENCHENKO, V., YOUSEFI, M., WISHART, D. S. & PLOTKIN, S. S. 2011. Intermolecular transmission of superoxide dismutase 1 misfolding in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 16398-16403.
- GRANUCCI, E. J., GRICIUC, A., MUELLER, K. A., MILLS, A. N., LE, H., DIOS, A. M., MCGINTY, D., PEREIRA, J., ELMALEH, D. & BERRY, J. D. 2019. Cromolyn sodium delays disease onset and is neuroprotective in the SOD1 G93A Mouse Model of amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific reports*, 9, 1-17.
- GREENHAFF, P., BODIN, K., SODERLUND, K. & HULTMAN, E. 1994. Effect of oral creatine supplementation on skeletal muscle phosphocreatine resynthesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 266, E725-E730.
- GROENEVELD, G., VAN KAN, H., TORAÑO, J. S., VELDINK, J., GUCHELAAR, H.-J., WOKKE, J. & VAN DEN BERG, L. 2001. Inter-and intraindividual variability of riluzole serum concentrations in patients with ALS. *Journal of the neurological sciences*, 191, 121-125.

- GROSSKREUTZ, J., VAN DEN BOSCH, L. & KELLER, B. U. 2010. Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell calcium*, 47, 165-174.
- GRUOL, D. & NELSON, T. 1997. Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Molecular neurobiology*, 15, 307-339.
- GUÉGAN, C., VILA, M., ROSOKLIJA, G., HAYS, A. P. & PRZEDBORSKI, S. 2001. Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience*, 21, 6569-6576.
- GURNEY, M. E., PU, H., CHIU, A. Y., DAL CANTO, M. C., POLCHOW, C. Y., ALEXANDER, D. D., CALIENDO, J., HENTATI, A., KWON, Y. W. & DENG, H.-X. 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264, 1772-1775.
- HAIDET-PHILLIPS, A. M., HESTER, M. E., MIRANDA, C. J., MEYER, K., BRAUN, L., FRANKES, A., SONG, S., LIKHTE, S., MURTHA, M. J., FOUST, K. D., RAO, M., EAGLE, A., KAMMESHEIDT, A., CHRISTENSEN, A., MENDELL, J. R., BURGHESE, A. H. M. & KASPAR, B. K. 2011. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature Biotechnology*, 29, 824.
- HALL, E. D., OOSTVEEN, J. A. & GURNEY, M. E. 1998. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia*, 23, 249-256.
- HAMMAN, J. H., ENSLIN, G. M. & KOTZÉ, A. F. 2005. Oral delivery of peptide drugs. *BioDrugs*, 19, 165-177.
- HANISCH, F., SKUDLAREK, A., BERNDT, J. & KORNHUBER, M. E. 2015. Characteristics of pain in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain and Behavior*, 5, e00296.
- HARDIMAN, O., VAN DEN BERG, L. H. & KIERNAN, M. C. 2011. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews neurology*, 7, 639-649.
- HASSANI, L., LEWIS, A. & RICHARD, J. 2015. Oral peptide delivery: technology landscape and current status. *OnDrugDelivery*, 59, 12-17.
- HATZIPETROS, T., KIDD, J. D., MORENO, A. J., THOMPSON, K., GILL, A. & VIEIRA, F. G. 2015. A quick phenotypic neurological scoring system for evaluating disease progression in the SOD1-G93A mouse model of ALS. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, e53257.
- HAYWORTH, C. R. & GONZALEZ-LIMA, F. 2009. Pre-symptomatic detection of chronic motor deficits and genotype prediction in congenic B6. SOD1G93A ALS mouse model. *Neuroscience*, 164, 975-985.
- HEIMAN-PATTERSON, T., DEITCH, J., BLANKENHORN, E., ERWIN, K., PERREAULT, M., ALEXANDER, B., BYERS, N., TOMAN, I. & ALEXANDER, G. 2005. Background and gender effects on survival in the TgN (SOD1-G93A) 1Gur mouse model of ALS. *Journal of the neurological sciences*, 236, 1-7.

- HENEKA, M. T., CARSON, M. J., KHOURY, J. E., LANDRETH, G. E., BROSSERON, F., FEINSTEIN, D. L., JACOBS, A. H., WYSS-CORAY, T., VITORICA, J., RANSOHOFF, R. M., HERRUP, K., FRAUTSCHY, S. A., FINSEN, B., BROWN, G. C., VERKHRATSKY, A., YAMANAKA, K., KOISTINAHO, J., LATZ, E., HALLE, A., PETZOLD, G. C., TOWN, T., MORGAN, D., SHINOHARA, M. L., PERRY, V. H., HOLMES, C., BAZAN, N. G., BROOKS, D. J., HUNOT, S., JOSEPH, B., DEIGENDESCH, N., GARASCHUK, O., BODDEKE, E., DINARELLO, C. A., BREITNER, J. C., COLE, G. M., GOLENBOCK, D. T. & KUMMER, M. P. 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurology*, 14, 388-405.
- HENKEL, J. S., BEERS, D. R., ZHAO, W. & APPEL, S. H. 2009. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 4, 389-398.
- HENRIQUES, A., PITZER, C. & SCHNEIDER, A. 2010. Neurotrophic growth factors for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: where do we stand? *Frontiers in neuroscience*, 4, 32.
- HENSLEY, K., ABDEL-MOATY, H., HUNTER, J., MHATRE, M., MOU, S., NGUYEN, K., POTAPOVA, T., PYE, Q. N., QI, M. & RICE, H. 2006. Primary glia expressing the G93A-SOD1 mutation present a neuroinflammatory phenotype and provide a cellular system for studies of glial inflammation. *Journal of neuroinflammation*, 3, 2.
- HENSLEY, K., FEDYNYSHYN, J., FERRELL, S., FLOYD, R. A., GORDON, B., GRAMMAS, P., HAMDHEYDARI, L., MHATRE, M., MOU, S., PYE, Q. N., STEWART, C., WEST, M., WEST, S. & WILLIAMSON, K. S. 2003. Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor α (TNF α) and TNF α -modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 14, 74-80.
- HENSLEY, K., FLOYD, R. A., GORDON, B., MOU, S., PYE, Q. N., STEWART, C., WEST, M. & WILLIAMSON, K. 2002. Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 82, 365-374.
- HOOTEN, K. G., BEERS, D. R., ZHAO, W. & APPEL, S. H. 2015. Protective and toxic neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotherapeutics*, 12, 364-375.
- HOWARTH, P. H., DURHAM, S. R., LEE, T. H., KAY, A. B., CHURCH, M. K. & HOLGATE, S. T. 1985. Influence of albuterol, cromolyn sodium and ipratropium bromide on the airway and circulating mediator responses to allergen bronchial provocation in asthma. *American Review of Respiratory Disease*, 132, 986-992.
- HUGNOT, J.-P. 2013. Isolate and culture neural stem cells from the mouse adult spinal cord. *Neural Progenitor Cells*. Springer.
- IKENAKA, K., ATSUTA, N., MAEDA, Y., HOTTA, Y., NAKAMURA, R., KAWAI, K., YOKOI, D., HIRAKAWA, A., TANIGUCHI, A. & MORITA, M. 2019. Increase of arginine dimethylation correlates with the progression and prognosis of ALS. *Neurology*, 92, e1868-e1877.

- INGRE, C., ROOS, P. M., PIEHL, F., KAMEL, F. & FANG, F. 2015. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical epidemiology*, 7, 181.
- JACKSON, A. U., GALECKI, A. T., BURKE, D. T. & MILLER, R. A. 2002. Mouse loci associated with life span exhibit sex-specific and epistatic effects. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 57, B9-B15.
- JANKOWSKY, J. L., YOUNKIN, L. H., GONZALES, V., FADALE, D. J., SLUNT, H. H., LESTER, H. A., YOUNKIN, S. G. & BORCHELT, D. R. 2007. Rodent A β modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 22707-22720.
- JARA, J. H., GENÇ, B., STANFORD, M. J., PYTEL, P., ROOS, R. P., WEINTRAUB, S., MESULAM, M. M., BIGIO, E. H., MILLER, R. J. & ÖZDINLER, P. H. 2017. Evidence for an early innate immune response in the motor cortex of ALS. *Journal of Neuroinflammation*, 14, 129.
- JAWORSKI, D. M., SOLOWAY, P., CATERINA, J. & FALLS, W. A. 2006. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression is regulated by multiple neural differentiation signals. *Journal of neurobiology*, 66, 82-94.
- JEYACHANDRAN, A., MERTENS, B., MCKISSICK, E. A. & MITCHELL, C. S. 2015. Type I Vs. Type II cytokine levels as a function of SOD1 G93A mouse amyotrophic lateral sclerosis disease progression. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 462.
- JIANG, N., LEITHOLD, L. H. E., POST, J., ZIEHM, T., MAULER, J., GREMER, L., CREMER, M., SCHARTMANN, E., SHAH, N. J., KUTZSCHE, J., LANGEN, K.-J., BREITKREUTZ, J., WILLBOLD, D. & WILLUWEIT, A. 2015. Preclinical pharmacokinetic studies of the tritium labelled D-Enantiomeric peptide D3 developed for the treatment of Alzheimer's disease. *PLOS ONE*, 10, e0128553.
- JOYCE, P. I., FRATTA, P., FISHER, E. M. & ACEVEDO-AROZENA, A. 2011. SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments. *Mammalian Genome*, 22, 420-448.
- KAWAMATA, T., AKIYAMA, H., YAMADA, T. & MCGEER, P. 1992. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *The American journal of pathology*, 140, 691.
- KELLER, A. F., GRAVEL, M. & KRIZ, J. 2011. Treatment with minocycline after disease onset alters astrocyte reactivity and increases microgliosis in SOD1 mutant mice. *Experimental neurology*, 228, 69-79.
- KERKSICK, C. & WILLOUGHBY, D. 2005. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *Journal of the international society of sports nutrition*, 2, 38.

- KIERNAN, M. C., VUCIC, S., CHEAH, B. C., TURNER, M. R., EISEN, A., HARDIMAN, O., BURRELL, J. R. & ZOING, M. C. 2011. Amyotrophic lateral sclerosis. *The lancet*, 377, 942-955.
- KLEIN, A. N., ZIEHM, T., TUSCHE, M., BUITENHUIS, J., BARTNIK, D., BOEDDRICH, A., WIGLEND, T., WANKER, E., FUNKE, S. A. & BRENER, O. 2016. Optimization of the all-D peptide D3 for A β oligomer elimination. *PLoS one*, 11, e0153035.
- KLEIN, A. N., ZIEHM, T., VAN GROEN, T., KADISH, I., ELFGEN, A., TUSCHE, M., THOMAIER, M., REISS, K., BRENER, O. & GREMER, L. 2017. Optimization of D-peptides for A β monomer binding specificity enhances their potential to eliminate toxic A β oligomers. *ACS chemical neuroscience*, 8, 1889-1900.
- KLIM, J. R., VANCE, C. & SCOTTER, E. L. 2019. Antisense oligonucleotide therapies for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Existing and emerging targets. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 110, 149-153.
- KLIVENYI, P., FERRANTE, R. J., MATTHEWS, R. T., BOGDANOV, M. B., KLEIN, A. M., ANDREASSEN, O. A., MUELLER, G., WERMER, M., KADDURAH-DAOUK, R. & BEAL, M. F. 1999. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature medicine*, 5, 347-350.
- KONAR, A., KALRA, R. S., CHAUDHARY, A., NAYAK, A., GURUPRASAD, K. P., SATYAMOORTHY, K., ISHIDA, Y., TERAOKA, K., KAUL, S. C. & WADHWA, R. 2020. Identification of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) as A Potent Neuro-Differentiating Natural Compound that Improves Cognitive and Physiological Functions in Animal Models of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in aging neuroscience*, 12, 328.
- KOSTIC, V., JACKSON-LEWIS, V., DE BILBAO, F., DUBOIS-DAUPHIN, M. & PRZEDBORSKI, S. 1997. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 277, 559-563.
- KREILAUS, F., GUERRA, S., MASANETZ, R., MENNE, V., YERBURY, J. & KARL, T. 2020. Novel behavioural characteristics of the superoxide dismutase 1 G93A (SOD1G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis include sex-dependent phenotypes. *Genes, Brain and Behavior*, 19, e12604.
- KRIZ, J., NGUYEN, M. D. & JULIEN, J.-P. 2002. Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease*, 10, 268-278.
- KROEMER, G. & REED, J. C. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nature medicine*, 6, 513-519.
- KUHLE, J., LINDBERG, R., REGENITER, A., MEHLING, M., STECK, A., KAPPOS, L. & CZAPLINSKI, A. 2009. Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis. *European journal of neurology*, 16, 771-774.

- KUSHNER, P., STEPHENSON, D. & WRIGHT, S. 1991. Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 50, 263-277.
- KUTZSCHE, J., JÜRGENS, D., WILLUWEIT, A., ADERMANN, K., FUCHS, C., SIMONS, S., WINDISCH, M., HÜMPEL, M., ROSSBERG, W., WOLZT, M. & WILLBOLD, D. 2020. Safety and pharmacokinetics of the orally available antiprionic compound PRI-002: A single and multiple ascending dose phase I study. *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)*, 6, e12001-e12001.
- KUTZSCHE, J., SCHEMMERT, S., TUSCHE, M., NEDDENS, J., RABL, R., JÜRGENS, D., BRENER, O., WILLUWEIT, A., HUTTER-PAIER, B. & WILLBOLD, D. 2017. Large-scale oral treatment study with the four most promising D3-derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules*, 22, 1693.
- LEE, J., RYU, H. & KOWALL, N. W. 2009. Motor neuronal protection by L-arginine prolongs survival of mutant SOD1 (G93A) ALS mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 384, 524-529.
- LEE, J. D., KUMAR, V., FUNG, J. N., RUITENBERG, M. J., NOAKES, P. G. & WOODRUFF, T. M. 2017. Pharmacological inhibition of complement C5a-C5a1 receptor signalling ameliorates disease pathology in the hSOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *British journal of pharmacology*, 174, 689-699.
- LEE, J. D., LIU, N., LEVIN, S. C., OTTOSSON, L., ANDERSSON, U., HARRIS, H. E. & WOODRUFF, T. M. 2019. Therapeutic blockade of HMGB1 reduces early motor deficits, but not survival in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroinflammation*, 16, 45.
- LEIGHTON, D. J., NEWTON, J., STEPHENSON, L. J., COLVILLE, S., DAVENPORT, R., GORRIE, G., MORRISON, I., SWINGLER, R., CHANDRAN, S. & PAL, S. 2019. Changing epidemiology of motor neurone disease in Scotland. *Journal of neurology*, 266, 817-825.
- LEITHOLD, L. H., JIANG, N., POST, J., ZIEHM, T., SCHARTMANN, E., KUTZSCHE, J., SHAH, N. J., BREITKREUTZ, J., LANGEN, K.-J. & WILLUWEIT, A. 2016a. Pharmacokinetic properties of a novel D-peptide developed to be therapeutically active against toxic β -amyloid oligomers. *Pharmaceutical research*, 33, 328-336.
- LEITHOLD, L. H. E., JIANG, N., POST, J., NIEMIETZ, N., SCHARTMANN, E., ZIEHM, T., KUTZSCHE, J., SHAH, N. J., BREITKREUTZ, J., LANGEN, K.-J., WILLUWEIT, A. & WILLBOLD, D. 2016b. Pharmacokinetic properties of tandem d-peptides designed for treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89, 31-38.
- LEITNER, M., MENZIES, S. & LUTZ, C. 2009. Working with ALS mice: Guidelines for preclinical testing & colony management. *The Jackson Laboratory*.
- LÉVEILLÉ, F., PAPADIA, S., FRICKER, M., BELL, K. F., SORIANO, F. X., MARTEL, M.-A., PUDDIFOOT, C., HABEL, M., WYLLIE, D. J. & IKONOMIDOU, C. 2010.

Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. *Journal of Neuroscience*, 30, 2623-2635.

- LEVINE, J. B., KONG, J., NADLER, M. & XU, Z. 1999. Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia*, 28, 215-224.
- LEWIS, C.-A., MANNING, J., ROSSI, F. & KRIEGER, C. 2012. The neuroinflammatory response in ALS: the roles of microglia and T cells. *Neurology research international*, 2012, 803701-803701.
- LEWIS, K. E., RASMUSSEN, A. L., BENNETT, W., KING, A., WEST, A. K., CHUNG, R. S. & CHUAH, M. I. 2014. Microglia and motor neurons during disease progression in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: changes in arginase1 and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 55.
- LI, Q. X., MOK, S. S., LAUGHTON, K. M., MCLEAN, C. A., VOLITAKIS, I., CHERNY, R. A., CHEUNG, N. S., WHITE, A. R. & MASTERS, C. L. 2006. Overexpression of A β is associated with acceleration of onset of motor impairment and superoxide dismutase 1 aggregation in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Aging cell*, 5, 153-165.
- LIANG, X., WANG, Q., SHI, J., LOKTEVA, L., BREYER, R. M., MONTINE, T. J. & ANDREASSON, K. 2008. The prostaglandin E2 EP2 receptor accelerates disease progression and inflammation in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 64, 304-314.
- LIBOUX, A. L., LEFEBVRE, P., ROUX, Y. L., TRUFFINET, P., AUBENEAU, M., KIRKESSELI, S. & MONTAY, G. 1997. Single-and multiple-dose pharmacokinetics of riluzole in white subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 37, 820-827.
- LIU, D. P., SCHMIDT, C., BILLINGS, T. & DAVISSON, M. T. 2003. Quantitative PCR genotyping assay for the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Biotechniques*, 35, 1170-1180.
- LIU, H., FUNKE, S. A. & WILLBOLD, D. 2010. Transport of Alzheimer disease amyloid- β -binding d-amino acid peptides across an in vitro blood-brain barrier model. *Rejuvenation research*, 13, 210-213.
- LIU, Z., CHENG, X., ZHONG, S., ZHANG, X., LIU, C., LIU, F. & ZHAO, C. 2020. Peripheral and Central Nervous System Immune Response Crosstalk in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Neuroscience*, 14.
- LOGROSCINO, G., TRAYNOR, B. J., HARDIMAN, O., CHIÒ, A., MITCHELL, D., SWINGLER, R. J., MILLUL, A., BENN, E. & BEGHI, E. 2010. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 81, 385-390.

- LONGINETTI, E. & FANG, F. 2019. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Current opinion in neurology*, 32, 771.
- LONGINETTI, E., REGODÓN WALLIN, A., SAMUELSSON, K., PRESS, R., ZACHAU, A., RONNEVI, L. O., KIERKEGAARD, M., ANDERSEN, P. M., HILLERT, J., FANG, F. & INGRE, C. 2018. The Swedish motor neuron disease quality registry. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 19, 528-537.
- LOUWERSE, E. S., WEVERLING, G. J., BOSSUYT, P. M., MEYJES, F. E. P. & DE JONG, J. V. 1995. Randomized, double-blind, controlled trial of acetylcysteine in amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology*, 52, 559-564.
- LUDOLPH, A. 2014. S1-Leitlinie Amyotrophe Lateralsklerose (Motoneuronerkrankungen). 7 <https://www.dgn.org/leitlinien/3012-II-18-II-amyotrophe-lateralsklerose-motoneuronerkrankungen>. Zugegriffen.
- LUDOLPH, A., DRORY, V., HARDIMAN, O., NAKANO, I., RAVITS, J., ROBBERECHT, W. & SHEFNER, J. 2015. A revision of the El Escorial criteria-2015. *Amyotroph lateral scler frontotemporal degener*, 16, 291-292.
- MAHALAKSHMI, R. & BALARAM, P. 2007. The use of D-amino acids in peptide design. *D-Amino Acids: A New Frontier in Amino Acid and Protein Research—Practical Methods and Protocols*, 415-430.
- MAIHOFNER, C., PROBST-COUSIN, S., BERGMANN, M., NEUNDORFER, B. & HEUSS, D. Localisation and expression of cyclooxygenase-1 and-2 in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES*, 2002. ELSEVIER SCIENCE BV PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS, S2-S2.
- MAJOOR-KRAKAUER, D., WILLEMS, P. & HOFMAN, A. 2003. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical genetics*, 63, 83-101.
- MAKKONEN, T., RUOTTINEN, H., PUHTO, R., HELMINEN, M. & PALMIO, J. 2018. Speech deterioration in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) after manifestation of bulbar symptoms. *International journal of language & communication disorders*, 53, 385-392.
- MAMMANA, S., FAGONE, P., CAVALLI, E., BASILE, M. S., PETRALIA, M. C., NICOLETTI, F., BRAMANTI, P. & MAZZON, E. 2018. The role of macrophages in neuroinflammatory and neurodegenerative pathways of alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and multiple sclerosis: Pathogenetic cellular effectors and potential therapeutic targets. *International journal of molecular sciences*, 19, 831.
- MARCUZZO, S., ZUCCA, I., MASTROPIETRO, A., DE ROSBO, N. K., CAVALCANTE, P., TARTARI, S., BONANNO, S., PREITE, L., MANTEGAZZA, R. & BERNASCONI, P. 2011. Hind limb muscle atrophy precedes cerebral neuronal degeneration in G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: A longitudinal MRI study. *Experimental Neurology*, 231, 30-37.

- MARTIN, L. J. 2000. p53 is abnormally elevated and active in the CNS of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease*, 7, 613-622.
- MARTINET, J., MONTAY, G. & RHODES, G. 1997. Pharmacokinetics and metabolism of riluzole. *Drugs of today*, 33, 587-594.
- MATSUO, N., TAKAO, K., NAKANISHI, K., YAMASAKI, N., TANDA, K. & MIYAKAWA, T. 2010. Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 4, 29.
- MATTEO, V. & ESPOSITO, E. 2003. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*, 2, 95-107.
- MAZZINI, L., FERRERO, I., LUPARELLO, V., RUSTICHELLI, D., GUNETTI, M., MARESCHI, K., TESTA, L., STECCO, A., TARLETTI, R. & MIGLIORETTI, M. 2010. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a phase I clinical trial. *Experimental neurology*, 223, 229-237.
- MAZZINI, L., MARESCHI, K., FERRERO, I., MIGLIORETTI, M., STECCO, A., SERVO, S., CARRIERO, A., MONACO, F. & FAGIOLI, F. 2012. Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study. *Cytotherapy*, 14, 56-60.
- MCCAMPBELL, A., COLE, T., WEGENER, A. J., TOMASSY, G. S., SETNICKA, A., FARLEY, B. J., SCHOCH, K. M., HOYE, M. L., SHABSOVICH, M. & SUN, L. 2018. Antisense oligonucleotides extend survival and reverse decrement in muscle response in ALS models. *The Journal of clinical investigation*, 128, 3558-3567.
- MCCAULEY, M. E. & BALOH, R. H. 2019. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta neuropathologica*, 137, 715-730.
- MCGEER, P. L. & MCGEER, E. G. 2002. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, 26, 459-470.
- MCGREGOR, D. P. 2008. Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Current opinion in pharmacology*, 8, 616-619.
- MEAD, R. J., BENNETT, E. J., KENNERLEY, A. J., SHARP, P., SUNYACH, C., KASHER, P., BERWICK, J., PETTMANN, B., BATTAGLIA, G. & AZZOUZ, M. 2011. Optimised and rapid pre-clinical screening in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One*, 6, e23244.
- MEHTA, P. R., JONES, A. R., OPIE-MARTIN, S., SHATUNOV, A., IACOANGELI, A., AL KHLIFAT, A., SMITH, B. N., TOPP, S., MORRISON, K. E. & SHAW, P. J. 2019. Younger age of onset in familial amyotrophic lateral sclerosis is a result of pathogenic gene variants, rather than ascertainment bias. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 90, 268-271.

- MELONI, B. P., MILANI, D., EDWARDS, A. B., ANDERTON, R. S., DOIG, R. L. H., FITZGERALD, M., PALMER, T. N. & KNUCKEY, N. W. 2015. Neuroprotective peptides fused to arginine-rich cell penetrating peptides: Neuroprotective mechanism likely mediated by peptide endocytic properties. *Pharmacology & therapeutics*, 153, 36-54.
- MIANA-MENA, F. J., GONZÁLEZ-MINGOT, C., LARRODÉ, P., MUÑOZ, M. J., OLIVÁN, S., FUENTES-BROTO, L., MARTÍNEZ-BALLARÍN, E., REITER, R. J., OSTA, R. & GARCÍA, J. J. 2011. Monitoring systemic oxidative stress in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology*, 258, 762-769.
- MIANA-MENA, F. J., MUÑOZ, M. J., YAGÜE, G., MENDEZ, M., MORENO, M., CIRIZA, J., ZARAGOZA, P. & OSTA, R. 2005. Optimal methods to characterize the G93A mouse model of ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 6, 55-62.
- MIAO, J., XU, F., DAVIS, J., OTTE-HÖLLER, I., VERBEEK, M. M. & VAN NOSTRAND, W. E. 2005. Cerebral microvascular amyloid beta protein deposition induces vascular degeneration and neuroinflammation in transgenic mice expressing human vasculotropic mutant amyloid beta precursor protein. *The American Journal of Pathology*, 167, 505-515.
- MILLER, C. M., ZAKRZEWSKI, A. M., IKIN, R. J., BOULTER, N. R., KATRIB, M., LEES, M. P., FULLER, S. J., WILEY, J. S. & SMITH, N. C. 2011. Dysregulation of the inflammatory response to the parasite, *Toxoplasma gondii*, in P2X7 receptor-deficient mice. *International journal for parasitology*, 41, 301-308.
- MILLER, R. G. & APPEL, S. H. 2017. Introduction to supplement: the current status of treatment for ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 18, 1-4.
- MILLER, R. G., MITCHELL, J. & MOORE, D. H. 2012. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *The Cochrane Library*.
- MILLER, S. M., SIMON, R. J., NG, S., ZUCKERMANN, R. N., KERR, J. M. & MOOS, W. H. 1995. Comparison of the proteolytic susceptibilities of homologous L-amino acid, D-amino acid, and N-substituted glycine peptide and peptoid oligomers. *Drug Development Research*, 35, 20-32.
- MILLER, T., CUDKOWICZ, M., SHAW, P. J., ANDERSEN, P. M., ATASSI, N., BUCELLI, R. C., GENGE, A., GLASS, J., LADHA, S. & LUDOLPH, A. L. 2020. Phase 1–2 trial of antisense oligonucleotide tofersen for SOD1 ALS. *New England Journal of Medicine*, 383, 109-119.
- MILLER, T. M., PESTRONK, A., DAVID, W., ROTHSTEIN, J., SIMPSON, E., APPEL, S. H., ANDRES, P. L., MAHONEY, K., ALLRED, P. & ALEXANDER, K. 2013. An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *The Lancet Neurology*, 12, 435-442.

- MOHAJERI, M. H., FIGLEWICZ, D. A. & BOHN, M. C. 1998. Selective loss of α motoneurons innervating the medial gastrocnemius muscle in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental neurology*, 150, 329-336.
- MOHAN, R., TOSOLINI, A. P. & MORRIS, R. 2014. Targeting the motor end plates in the mouse hindlimb gives access to a greater number of spinal cord motor neurons: An approach to maximize retrograde transport. *Neuroscience*, 274, 318-330.
- MORENO-MARTINEZ, L., CALVO, A. C., MUÑOZ, M. J. & OSTA, R. 2019. Are circulating cytokines reliable biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis? *International journal of molecular sciences*, 20, 2759.
- MORISHITA, M. & PEPPAS, N. A. 2006. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? *Drug discovery today*, 11, 905-910.
- MORRICE, J. R., GREGORY-EVANS, C. Y. & SHAW, C. A. 2018. Animal models of amyotrophic lateral sclerosis: A comparison of model validity. *Neural regeneration research*, 13, 2050.
- MÜNCH, C., O'BRIEN, J. & BERTOLOTTI, A. 2011. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 3548-3553.
- NAGY, D., KATO, T. & KUSHNER, P. 1994. Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroscience research*, 38, 336-347.
- NAKAYAMA, K. 1997. Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochemical Journal*, 327, 625-635.
- NEUMANN, M., SAMPATHU, D. M., KWONG, L. K., TRUAX, A. C., MICSENYI, M. C., CHOU, T. T., BRUCE, J., SCHUCK, T., GROSSMAN, M. & CLARK, C. M. 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314, 130-133.
- NGUYEN, M. D., D'AIGLE, T., GOWING, G., JULIEN, J.-P. & RIVEST, S. 2004. Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience*, 24, 1340-1349.
- NIJSEN, J., COMLEY, L. H. & HEDLUND, E. 2017. Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*, 133, 863-885.
- NIZZARDO, M., SIMONE, C., FALCONE, M., RIBOLDI, G., RIZZO, F., MAGRI, F., BRESOLIN, N., COMI, G. P. & CORTI, S. 2012. Research advances in gene therapy approaches for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 1641-1650.

- O'ROURKE, J., BOGDANIK, L., YANEZ, A., LALL, D., WOLF, A., MUHAMMAD, A., HO, R., CARMONA, S., VIT, J. & ZARROW, J. 2016. C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science*, 351, 1324-1329.
- OGAWA, N., HIROSE, Y., OHARA, S., ONO, T. & WATANABE, Y. 1985. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 50, 435-41.
- OHGOMORI, T., YAMADA, J., TAKEUCHI, H., KADOMATSU, K. & JINNO, S. 2016. Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD 1G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*, 43, 1340-1351.
- OHGOMORI, T., YAMASAKI, R., TAKEUCHI, H., KADOMATSU, K., KIRA, J.-I. & JINNO, S. 2017. Differential activation of neuronal and glial STAT3 in the spinal cord of the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*, 46, 2001-2014.
- OHTA, Y., YAMASHITA, T., NOMURA, E., HISHIKAWA, N., IKEGAMI, K., OSAKADA, Y., MATSUMOTO, N., KAWAHARA, Y., YUNOKI, T. & TAKAHASHI, Y. 2020. Improvement of a decreased anti-oxidative activity by edaravone in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of the neurological sciences*, 415, 116906.
- OLUBIYI, O., FRENZEL, D., BARTNIK, D., GLUCK, J., BRENER, O., NAGEL-STEGER, L., FUNKE, S., WILLBOLD, D. & STRODEL, B. 2014. Amyloid aggregation inhibitory mechanism of arginine-rich D-peptides. *Current medicinal chemistry*, 21, 1448-1457.
- OPIE-MARTIN, S., OSSHER, L., BREDIN, A., KULKA, A., PEARCE, N., TALBOT, K. & AL-CHALABI, A. 2020. Motor Neuron Disease Register for England, Wales and Northern Ireland—an analysis of incidence in England. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 1-8.
- OSKARSSON, B., HORTON, D. K. & MITSUMOTO, H. 2015. Potential environmental factors in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologic clinics*, 33, 877-888.
- ÖZDINLER, P. H., BENN, S., YAMAMOTO, T. H., GÜZEL, M., BROWN, R. H. & MACKLIS, J. D. 2011. Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G93A transgenic ALS mice. *Journal of Neuroscience*, 31, 4166-4177.
- PALESE, F., SARTORI, A., VERRIELLO, L., ROS, S., PASSADORE, P., MANGANOTTI, P., BARBONE, F. & PISA, F. E. 2019. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Friuli-Venezia Giulia, North-Eastern Italy, 2002-2014: a retrospective population-based study. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 20, 90-99.
- PAPADIMITRIOU, D., LE VERCHE, V., JACQUIER, A., IKIZ, B., PRZEDBORSKI, S. & RE, D. B. 2010. Inflammation in ALS and SMA: sorting out the good from the evil. *Neurobiology of disease*, 37, 493-502.

- PARK, J. H., ELPERS, C., REUNERT, J., MCCORMICK, M. L., MOHR, J., BISKUP, S., SCHWARTZ, O., RUST, S., GRÜNEBERG, M. & SEELHÖFER, A. 2019. SOD1 deficiency: a novel syndrome distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 142, 2230-2237.
- PASINELLI, P., HOUSEWEART, M. K., BROWN, R. H. & CLEVELAND, D. W. 2000. Caspase-1 and-3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu, Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 13901-13906.
- PASTULA, D. M., MOORE, D. H. & BEDLACK, R. S. 2012. Creatine for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- PATEL, P., JULIEN, J.-P. & KRIZ, J. 2015. Early-stage treatment with Withaferin A reduces levels of misfolded superoxide dismutase 1 and extends lifespan in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotherapeutics*, 12, 217-233.
- PATIN, F., CORCIA, P., VOURC'H, P., NADAL-DESBARATS, L., BARANEK, T., GOOSSENS, J.-F., MAROULLAT, S., DESSEIN, A.-F., DESCAT, A. & HOUNOUM, B. M. 2017. Omics to explore amyotrophic lateral sclerosis evolution: the central role of arginine and proline metabolism. *Molecular neurobiology*, 54, 5361-5374.
- PEDERSEN, B. K. & FEBBRAIO, M. A. 2008. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological reviews*, 88, 1379-1406.
- PEHAR, M., HARLAN, B. A., KILLOY, K. M. & VARGAS, M. R. 2017. Role and therapeutic potential of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Current pharmaceutical design*, 23, 5010-5021.
- PEÑA-OLIVER, Y., SANCHEZ-ROIGE, S., STEPHENS, D. N. & RIPLEY, T. L. 2014. Alpha-synuclein deletion decreases motor impulsivity but does not affect risky decision making in a mouse Gambling Task. *Psychopharmacology*, 231, 2493-2506.
- PÉREZ-GONZÁLEZ, A. & GALANO, A. 2011. OH radical scavenging activity of edaravone: mechanism and kinetics. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115, 1306-1314.
- PERSKY, A. M., BRAZEAU, G. A. & HOCHHAUS, G. 2003. Pharmacokinetics of the dietary supplement creatine. *Clinical pharmacokinetics*, 42, 557-574.
- PETRI, S., KIAEI, M., DAMIANO, M., HILLER, A., WILLE, E., MANFREDI, G., CALINGASAN, N. Y., SZETO, H. H. & BEAL, M. F. 2006. Cell-permeable peptide antioxidants as a novel therapeutic approach in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry*, 98, 1141-1148.
- PFOHL, S. R., HALICEK, M. T. & MITCHELL, C. S. 2015. Characterization of the contribution of genetic background and gender to disease progression in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis. *Journal of neuromuscular diseases*, 2, 137-150.

- PHILIPS, T. & ROBBERECHT, W. 2011. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurology*, 10, 253-263.
- PHILIPS, T. & ROTHSTEIN, J. D. 2014. Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental neurology*, 262, 111-120.
- POMPL, P., HO, L., BIANCHI, M., MCMANUS, T., QIN, W. & PASINETTI, G. 2003. A therapeutic role for cyclooxygenase-2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The FASEB Journal*, 17, 725-727.
- PRADO, L. D. G. R., ROCHA, N. P., DE SOUZA, L. C., BICALHO, I. C. S., GOMEZ, R. S., VIDIGAL-LOPES, M., BRAZ, N. F. T., VIEIRA, É. L. M. & TEIXEIRA, A. L. 2018. Longitudinal assessment of clinical and inflammatory markers in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 394, 69-74.
- RALPH, G. S., RADCLIFFE, P. A., DAY, D. M., CARTHY, J. M., LEROUX, M. A., LEE, D. C., WONG, L.-F., BILSLAND, L. G., GREENSMITH, L. & KINGSMAN, S. M. 2005. Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nature medicine*, 11, 429-433.
- RAO, S. D. & WEISS, J. H. 2004. Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends in neurosciences*, 27, 17-23.
- RATNER, P. H., EHRLICH, P. M., FINEMAN, S. M., MELTZER, E. O. & SKONER, D. P. Use of intranasal cromolyn sodium for allergic rhinitis. *Mayo Clinic Proceedings*, 2002. Elsevier, 350-354.
- REAUME, A. G., ELLIOTT, J. L., HOFFMAN, E. K., KOWALL, N. W., FERRANTE, R. J., SIWEK, D. R., WILCOX, H. M., FLOOD, D. G., BEAL, M. F. & BROWN, R. H. 1996. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature genetics*, 13, 43-47.
- REED, J. C. 2000. Mechanisms of apoptosis. *The American journal of pathology*, 157, 1415-1430.
- RENTON, A. E., CHIÒ, A. & TRAYNOR, B. J. 2014. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature neuroscience*, 17, 17.
- RENTON, A. E., MAJOUNIE, E., WAITE, A., SIMÓN-SÁNCHEZ, J., ROLLINSON, S., GIBBS, J. R., SCHYMICK, J. C., LAAKSOVIRTA, H., VAN SWIETEN, J. C. & MYLLYKANGAS, L. 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72, 257-268.
- ROBBERECHT, W., AGUIRRE, T., VAN DEN BOSCH, L., TILKIN, P., CASSIMAN, J.-J. & MATTHIJS, G. 1996. D90A heterozygosity in the SOD1 gene is associated with familial and apparently sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 47, 1336-1339.

- ROBBERECHT, W. & PHILIPS, T. 2013. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neuroscience*, 14, 248.
- ROBERTS, K., ZEINEDDINE, R., CORCORAN, L., LI, W., CAMPBELL, I. L. & YERBURY, J. J. 2013. Extracellular aggregated Cu/Zn superoxide dismutase activates microglia to give a cytotoxic phenotype. *Glia*, 61, 409-419.
- ROGERS, D. C., FISHER, E. M. C., BROWN, S. D. M., PETERS, J., HUNTER, A. J. & MARTIN, J. E. 1997. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mammalian Genome*, 8, 711-713.
- ROGERS, D. C., PETERS, J., MARTIN, J. E., BALL, S., NICHOLSON, S. J., WITHERDEN, A. S., HAFEZPARAST, M., LATCHAM, J., ROBINSON, T. L., QUILTER, C. A. & FISHER, E. M. C. 2001. SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neuroscience Letters*, 306, 89-92.
- ROGNER, U. C. & AVNER, P. 2003. Congenic mice: cutting tools for complex immune disorders. *Nature Reviews Immunology*, 3, 243-252.
- ROSEN, D. R., SIDDIQUE, T., PATTERSON, D., FIGLEWICZ, D. A., SAPP, P., HENTATI, A., DONALDSON, D., GOTO, J., O'REGAN, J. P. & DENG, H.-X. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362, 59-62.
- ROSENBOHM, A., PETER, R. S., ERHARDT, S., LULÉ, D., ROTHENBACHER, D., LUDOLPH, A. C., NAGEL, G. & GROUP, A. R. S. 2017. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Southern Germany. *Journal of neurology*, 264, 749-757.
- ROSENFELD, J., KING, R. M., JACKSON, C. E., BEDLACK, R. S., BAROHN, R. J., DICK, A., PHILLIPS, L. H., CHAPIN, J., GELINAS, D. F. & LOU, J.-S. 2008. Creatine monohydrate in ALS: effects on strength, fatigue, respiratory status and ALSFRS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 9, 266-272.
- ROTHSTEIN, J. D. 2009. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*, 65, S3-S9.
- ROTHSTEIN, J. D. 2017. Edaravone: a new drug approved for ALS. *Cell*, 171, 725.
- ROTHSTEIN, J. D., MARTIN, L. J. & KUNCL, R. W. 1992. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 326, 1464-1468.
- ROTHSTEIN, J. D., VAN KAMMEN, M., LEVEY, A. I., MARTIN, L. J. & KUNCL, R. W. 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 38, 73-84.

- RUDNICK, N. D., GRIFFEY, C. J., GUARNIERI, P., GERBINO, V., WANG, X., PIERSAINT, J. A., TAPIA, J. C., RICH, M. M. & MANIATIS, T. 2017. Distinct roles for motor neuron autophagy early and late in the SOD1G93A mouse model of ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, E8294-E8303.
- RUIZ-RUIZ, C., GARCÍA-MAGRO, N., NEGREDO, P., AVENDAÑO, C., BHATTACHARYA, A., CEUSTERS, M. & GARCÍA, A. G. 2020. Chronic administration of P2X7 receptor antagonist JNJ-47965567 delays disease onset and progression, and improves motor performance in ALS SOD1G93A female mice. *Disease models & mechanisms*, 13.
- SCHARTMANN, E., SCHEMMERT, S., NIEMIETZ, N., HONOLD, D., ZIEHM, T., TUSCHE, M., ELFGEN, A., GERING, I., BRENER, O. & SHAH, N. J. 2018a. In Vitro Potency and Preclinical Pharmacokinetic Comparison of All-D-Enantiomeric Peptides Developed for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64, 859-873.
- SCHARTMANN, E., SCHEMMERT, S., ZIEHM, T., LEITHOLD, L. H., JIANG, N., TUSCHE, M., SHAH, N. J., LANGEN, K.-J., KUTZSCHE, J. & WILLBOLD, D. 2018b. Comparison of blood-brain barrier penetration efficiencies between linear and cyclic all-d-enantiomeric peptides developed for the treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 114, 93-102.
- SHELLER, J., CHALARIS, A., SCHMIDT-ARRAS, D. & ROSE-JOHN, S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813, 878-888.
- SCHEMMERT, S., SCHARTMANN, E., HONOLD, D., ZAFIU, C., ZIEHM, T., LANGEN, K.-J., SHAH, N. J., KUTZSCHE, J., WILLUWEIT, A. & WILLBOLD, D. 2019a. Deceleration of the neurodegenerative phenotype in pyroglutamate-A β accumulating transgenic mice by oral treatment with the A β oligomer eliminating compound RD2. *Neurobiology of Disease*, 124, 36-45.
- SCHEMMERT, S., SCHARTMANN, E., ZAFIU, C., KASS, B., HARTWIG, S., LEHR, S., BANNACH, O., LANGEN, K.-J., SHAH, N. J. & KUTZSCHE, J. 2019b. A β oligomer elimination restores cognition in transgenic Alzheimer's mice with full-blown pathology. *Molecular neurobiology*, 56, 2211-2223.
- SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S. & ELICEIRI, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9, 671-675.
- SCHUMACHER, T. N., MAYR, L. M., MINOR, D. L., MILHOLLEN, M. A., BURGESS, M. W. & KIM, P. S. 1996. Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display. *Science*, 271, 1854-1857.
- SHIBATA, N. 2001. Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Neuropathology*, 21, 82-92.
- SHOESMITH, C. L., FINDLATER, K., ROWE, A. & STRONG, M. J. 2007. Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis with respiratory onset. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 78, 629-631.

- SIEGMUND, A., LANGNAESE, K. & WOTJAK, C. T. 2005. Differences in extinction of conditioned fear in C57BL/6 substrains are unrelated to expression of α -synuclein. *Behavioural brain research*, 157, 291-298.
- SKAPER, S. D., DEBETTO, P. & GIUSTI, P. 2010. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *The FASEB Journal*, 24, 337-345.
- SOFRONIEW, M. V. & VINTERS, H. V. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119, 7-35.
- SOLOMONOV, Y., HADAD, N. & LEVY, R. 2016. Reduction of cytosolic phospholipase A2 α upregulation delays the onset of symptoms in SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 13, 134.
- SPECHT, C. G. & SCHOEPPFER, R. 2001. Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC neuroscience*, 2, 1-9.
- SUN, N., A FUNKE, S. & WILLBOLD, D. 2012. A survey of peptides with effective therapeutic potential in Alzheimer's disease rodent models or in human clinical studies. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12, 388-398.
- SZETO, H. H. 2008. Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia–reperfusion injury. *Antioxidants & redox signaling*, 10, 601-620.
- SZETO, H. H. & SCHILLER, P. W. 2011. Novel therapies targeting inner mitochondrial membrane—from discovery to clinical development. *Pharmaceutical research*, 28, 2669-2679.
- TADROS, M. A., HARRIS, B. M., ANDERSON, W. B., BRICHTA, A. M., GRAHAM, B. A. & CALLISTER, R. J. 2012. Are all spinal segments equal: intrinsic membrane properties of superficial dorsal horn neurons in the developing and mature mouse spinal cord. *Journal of Physiology*, 590, 2409-2425.
- TAKEI, K., OMURA, T., NAKAMARU, Y., KAKUBARI, M., NATORI, T., SHIIDE, Y., NISHIMURA, Y., AKIMOTO, M. & HIRAI, M. 2020. Edaravone for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Oral Formulation and Its Development Plan (1042). AAN Enterprises.
- TANG, D. Q., LI, Y. J., LI, Z., BIAN, T. T., CHEN, K., ZHENG, X. X., YU, Y. Y. & JIANG, S. S. 2015. Study on the interaction of plasma protein binding rate between edaravone and taurine in human plasma based on HPLC analysis coupled with ultrafiltration technique. *Biomedical Chromatography*, 29, 1137-1145.
- TAYLOR, J. P., BROWN, R. H. & CLEVELAND, D. W. 2016. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*, 539, 197-206.
- THOMSEN, G. M., GOWING, G., SVENDSEN, S. & SVENDSEN, C. N. 2014. The past, present and future of stem cell clinical trials for ALS. *Experimental neurology*, 262, 127-137.

- TOLBA, M. F., AZAB, S. S., KHALIFA, A. E., ABDEL-RAHMAN, S. Z. & ABDEL-NAIM, A. B. 2013. Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: A review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB life*, 65, 699-709.
- TONDO, G., IACCARINO, L., CERAMI, C., VANOLI, G. E., PRESOTTO, L., MASIELLO, V., COLIVA, A., SALVI, F., BARTOLOMEI, I. & MOSCA, L. 2020. 11C-PK11195 PET-based molecular study of microglia activation in SOD1 amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 7, 1513-1523.
- TORRES, P., CACABELOS, D., PAIRADA, J., BAUER, K. C., BOADA, J., FONTDEVILA, L., ROSSI, C., POVEDANO, M., FERRER, I. & PAMPLONA, R. 2020. Gender-specific beneficial effects of docosahexaenoic acid dietary supplementation in G93A-SOD1 Amyotrophic Lateral Sclerosis mice. *Neurotherapeutics*, 17, 269-281.
- TORTELLI, R., ZECCA, C., PICCININNI, M., BENMAHAMED, S., DELL'ABATE, M. T., BARULLI, M. R., CAPOZZO, R., BATTISTA, P. & LOGROSCINO, G. 2020. Plasma inflammatory cytokines are elevated in ALS. *Frontiers in neurology*, 11.
- TRIST, B., HILTON, J. B., CROUCH, P. J., HARE, D. J. & DOUBLE, K. L. 2020. Superoxide dismutase 1 in health and disease: How a front-line antioxidant becomes neurotoxic. *Angewandte Chemie*.
- TSANG, C. K., LIU, Y., THOMAS, J., ZHANG, Y. & ZHENG, X. S. 2014. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nature communications*, 5, 1-11.
- TURNER, M., CAGNIN, A., TURKHEIMER, F., MILLER, C., SHAW, C., BROOKS, D., LEIGH, P. & BANATI, R. 2004. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiology of disease*, 15, 601-609.
- TURNER, M. D., NEDJAI, B., HURST, T. & PENNINGTON, D. J. 2014. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843, 2563-2582.
- TYLER, A. L., JI, B., GATTI, D. M., MUNGER, S. C., CHURCHILL, G. A., SVENSON, K. L. & CARTER, G. W. 2017. Epistatic networks jointly influence phenotypes related to metabolic disease and gene expression in diversity outbred mice. *Genetics*, 206, 621-639.
- UCCELLI, A., MILANESE, M., PRINCIPATO, M. C., MORANDO, S., BONIFACINO, T., VERGANI, L., GIUNTI, D., VOCI, A., CARMINATI, E. & GIRIBALDI, F. 2012. Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Medicine*, 18, 794-804.
- UENAL, H., ROSENBOHM, A., KUFELDT, J., WEYDT, P., GODER, K., LUDOLPH, A., ROTHENBACHER, D., NAGEL, G. & 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, e93932.

- URBANI, A. & BELLUZZI, O. 2000. Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *European Journal of Neuroscience*, 12, 3567-3574.
- VAN GROEN, T., SCHEMMERT, S., BRENER, O., GREMER, L., ZIEHM, T., TUSCHE, M., NAGEL-STEGER, L., KADISH, I., SCHARTMANN, E., ELFGEN, A., JÜRGENS, D., WILLUWEIT, A., KUTZSCHE, J. & WILLBOLD, D. 2017. The A β oligomer eliminating D-enantiomeric peptide RD2 improves cognition without changing plaque pathology. *Scientific Reports*, 7, 16275.
- VERCELLI, A., MEREUTA, O., GARBOSSA, D., MURACA, G., MARESCHI, K., RUSTICHELLI, D., FERRERO, I., MAZZINI, L., MADON, E. & FAGIOLI, F. 2008. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease*, 31, 395-405.
- VLIEGHE, P., LISOWSKI, V., MARTINEZ, J. & KHRESTCHATISKY, M. 2010. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug discovery today*, 15, 40-56.
- WANG, L., SHARMA, K., DENG, H.-X., SIDDIQUE, T., GRISOTTI, G., LIU, E. & ROOS, R. P. 2008. Restricted expression of mutant SOD1 in spinal motor neurons and interneurons induces motor neuron pathology. *Neurobiology of Disease*, 29, 400-408.
- WEYDT, P., HONG, S. Y., KLIOT, M. & MÖLLER, T. 2003. Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *Neuroreport*, 14, 1051-1054.
- WEYDT, P. & MÖLLER, T. 2005. Neuroinflammation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*, 16, 527.
- WEYDT, P., YUEN, E. C., RANSOM, B. R. & MÖLLER, T. 2004. Increased cytotoxic potential of microglia from ALS-transgenic mice. *Glia*, 48, 179-182.
- WIESEHAN, K., BUDER, K., LINKE, R. P., PATT, S., STOLDT, M., UNGER, E., SCHMITT, B., BUCCI, E. & WILLBOLD, D. 2003. Selection of D-amino-acid peptides that bind to Alzheimer's disease amyloid peptide A β 1-42 by mirror image phage display. *Chembiochem*, 4, 748-753.
- WIESEHAN, K. & WILLBOLD, D. 2003. Mirror-image phage display: aiming at the mirror. *ChemBioChem*, 4, 811-815.
- WIJESEKERA, L. C. & LEIGH, P. N. 2009. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet journal of rare diseases*, 4, 3.
- WILLBOLD, D. & KUTZSCHE, J. 2019. Do We Need Anti-Prion Compounds To Treat Alzheimer's Disease? *Molecules*, 24, 2237.
- WONG, P. C., PARDO, C. A., BORCHELT, D. R., LEE, M. K., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., SISODIA, S. S., CLEVELAND, D. W. & PRICE, D. L. 1995. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*, 14, 1105-1116.

- WOOLEY, C. M., SHER, R. B., KALE, A., FRANKEL, W. N., COX, G. A. & SEBURN, K. L. 2005. Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1 (G93A) mice. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 32, 43-50.
- WU, G., FANG, Y.-Z., YANG, S., LUPTON, J. R. & TURNER, N. D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition*, 134, 489-492.
- YAMADA, M., HAYASHI, H., YUUKI, M., MATSUSHIMA, N., YUAN, B. & TAKAGI, N. 2018. Furin inhibitor protects against neuronal cell death induced by activated NMDA receptors. *Scientific reports*, 8, 1-9.
- YAMANAKA, K., CHUN, S. J., BOILLEE, S., FUJIMORI-TONOU, N., YAMASHITA, H., GUTMANN, D. H., TAKAHASHI, R., MISAWA, H. & CLEVELAND, D. W. 2008. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature neuroscience*, 11, 251-253.
- YANG, Y.-Q., ZHENG, Y.-H., ZHANG, C.-T., LIANG, W.-W., WANG, S.-Y., WANG, X.-D., WANG, Y., WANG, T.-H., JIANG, H.-Q. & FENG, H.-L. 2020. Wild-type p53-induced phosphatase 1 down-regulation promotes apoptosis by activating the DNA damage-response pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 134, 104648.
- YASOJIMA, K., TOURTELLOTTE, W., MCGEER, E. & MCGEER, P. 2001. Marked increase in cyclooxygenase-2 in ALS spinal cord: implications for therapy. *Neurology*, 57, 952-956.
- YIANGOU, Y., FACER, P., DURRENBERGER, P., CHESSELL, I. P., NAYLOR, A., BOUNTRA, C., BANATI, R. R. & ANAND, P. 2006. COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC neurology*, 6, 1-14.
- YOSHIHARA, T., ISHIGAKI, S., YAMAMOTO, M., LIANG, Y., JUN, NIWA, I., TAKEUCHI, H., DOYU, M. & SOBUE, G. 2002. Differential expression of inflammation-and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry*, 80, 158-167.
- ZHANG, C., GRICIUC, A., HUDRY, E., WAN, Y., QUINTI, L., WARD, J., FORTE, A. M., SHEN, X., RAN, C. & ELMALEH, D. R. 2018. Cromolyn reduces levels of the Alzheimer's disease-associated amyloid β -protein by promoting microglial phagocytosis. *Scientific reports*, 8, 1-9.
- ZHANG, T., LOSCHWITZ, J., STRODEL, B., NAGEL-STEGER, L. & WILLBOLD, D. 2019. Interference with amyloid- β nucleation by transient ligand interaction. *Molecules*, 24, 2129.
- ZHAO, C., ZHANG, C., ZHOU, S., XIE, Y., WANG, Y., HUANG, H., SHANG, Y., LI, W., ZHOU, C. & YU, M. 2007. Human mesenchymal stromal cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice. *Cytotherapy*, 9, 414-426.

- ZHAO, K., LUO, G., GIANNELLI, S. & SZETO, H. H. 2005. Mitochondria-targeted peptide prevents mitochondrial depolarization and apoptosis induced by tert-butyl hydroperoxide in neuronal cell lines. *Biochemical pharmacology*, 70, 1796-1806.
- ZHAO, W., BEERS, D. R. & APPEL, S. H. 2013. Immune-mediated mechanisms in the pathoprogession of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 8, 888-899.
- ZHENG, C., NENNESMO, I., FADEEL, B. & HENTER, J. I. 2004. Vascular endothelial growth factor prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 56, 564-567.
- ZHU, S., STAVROVSKAYA, I. G., DROZDA, M., KIM, B. Y. S., ONA, V., LI, M., SARANG, S., LIU, A. S., HARTLEY, D. M., WU, D. C., GULLANS, S., FERRANTE, R. J., PRZEDBORSKI, S., KRISTAL, B. S. & FRIEDLANDER, R. M. 2002. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*, 417, 74-78.
- ZIEHM, T., BRENER, O., VAN GROEN, T., KADISH, I., FRENZEL, D., TUSCHE, M., KUTZSCHE, J., REIß, K., GREMER, L. & NAGEL-STEGER, L. 2016. Increase of positive net charge and conformational rigidity enhances the efficacy of D-enantiomeric peptides designed to eliminate cytotoxic A β species. *ACS chemical neuroscience*, 7, 1088-1096.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Dieter Willbold für die Gelegenheit meine Doktorarbeit am IBI-7 anfertigen zu können, der Realisierung dieses Projektes und seiner wissenschaftlichen und konstruktiven Unterstützung während der gesamten Phase meiner Promotion.

Zudem gebührt mein Dank Prof. Dr. Karl-Josef Langen für die Übernahme des Koreferats und die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Janine Kutzsche und Dr. Antje Willuweit für die zahlreichen und unermüdlichen fachlichen Gespräche, Ratschläge und Anmerkungen, die mich immer neue Aspekte und Ansätze entdecken ließen. Euer Verständnis für meine Fragen und auch die vielen nichtwissenschaftlichen und motivierenden Gespräche haben mich in meiner Arbeit unterstützt.

Weiterhin gilt mein Dank den vielen lieben Kolleginnen und Kollegen des IBI-7 und INM-4 für die hilfsbereite und kompetente Unterstützung, die lebhaften Diskussionen und Fachgespräche. Den folgenden Personen möchte ich einen besonderen Dank für die stets angenehme, manchmal lustige und immer freundliche Zusammenarbeit aussprechen: Dr. Sarah Schemmert, Dominik Honold, Luana Camargo, Ian Gering, Bettina Kass, Markus Tusche, Esther Wollert, Anja Schaffrath, Karoline Santur, Nicole Niemietz, Michael Schöneck, Carina Balduin, Dr. Carina Stegmayer und Dr. Philip Lohmann.

Zudem möchte ich mich bei einigen Leuten bedanken, die uns im IBI-7 in vielerlei Hinsicht die (Alltags-)Arbeit erleichtern: unserem „Bestellungsteam“ Nicole Kremer, Nicole „Nici“ Bleffert und Viktoria Kraemer-Schulien, den Kolleginnen des Sekretariats und der Verwaltung Dorothea Stobbe, Christina Braun, Tugba Özdal und Sabine Pick. Mein Dank gilt weiter Anne Cousin für die vielen, lustigen und anregenden Gespräche zur Mittagspause in der guten alten Institutsküche und Volker Söhnitz, der mir stets im Kampf mit meinen PC und den verbundenen Scharmützeln zur Seite stand.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei einigen ehemaligen Kollegen und Kolleginnen des IBI-7 und INM-4, für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit, die anregenden Diskussionen bedanken: Dr. Leonie Leithold, Dr. Tina Dunkelman, Dr. Nan Jiang, Dr. Tamar Ziehm, Dr. Anne Elfgen, Dr. Dennis Oliveira, Verena Graf und Dr. Elena Schartmann.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Tierhauses bin ich sehr dankbar für die gute und tatkräftige Unterstützung während der letzten Jahre.

Danken möchte ich außerdem Dr. Julia Sanwald, Dr. Indra Simons und Lena Mangels, insbesondere für die Rücksichtnahme im Büro, wenn ich mal wieder singend in Datenauswertungen versunken bin. Es hat sehr viel Spaß mit euch gemacht und ich habe die Zeit sehr genossen. Ihr habt jederzeit ein offenes Ohr für mich gehabt und mich immer wieder zum Lachen gebracht.

Ein besonderer Dank kommt meinem Ehemann Alexander, meiner Mutter Rita, meinem Vater Paul und meinen Schwestern zu, die mir immer wieder Zuversicht gegeben haben, auch in schwierigen Phasen mein Ziel weiterzuverfolgen. Des Weiteren möchte ich mich bei dem Rest meiner Familie und meinen Freunden bedanken, besonders den „Bingo Bunnies“. Eure guten Ratschläge und Ablenkungen haben mir stets geholfen, wenn ich nicht weiterwusste.

Vielen Dank euch allen, dass ihr immer an mich geglaubt habt, für eure Motivation, Geduld und euer Verständnis.

Liste der Publikationen

Post J, Kogel V, Schaffrath A, Lohmann P, Shah NJ, Langen K-J, Willbold D, Willuweit A and Kutzsche J. (2021). "A novel anti-inflammatory D-peptide inhibits disease phenotype progression in an ALS mouse model" *Molecules* 26(6), 1590

Post J, Schaffrath A, Gering I, Hartwig S, Lehr S, Shah NJ, Langen K-J, Willbold D, Kutzsche J and Willuweit A. "Oral treatment with RD2RD2 impedes development of motoric phenotype and delays symptom onset in SOD1*G93A transgenic mice" (*Manuscript under revision*)

Liste der Posterpräsentationen

2019

- Post J, Schaffrath A, Langen K-J, Willuweit A, Kutzsche J, Willbold D
Treatment of transgenic SOD1 ALS mice with the all-D-enantiomeric peptide RD2RD2
Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases "Aggregates, Autophagy, Prions and Biomarkers", 12.-14. November 2019, Düsseldorf, Deutschland

2018

- Post J, Schaffrath A, Langen K-J, Willuweit A, Kutzsche J, Willbold D
Treatment of the SOD1*G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with an all-D-enantiomeric peptide
29th International Symposium on ALS/MND, 06.-09. Dezember 2018, Glasgow, Vereinigtes Königreich Großbritanniens
- Post J, Kogel V, Langen K-J, Willuweit A, Kutzsche J, Willbold D
Treatment of the SOD1*G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with an all-D-enantiomeric peptide
Molecular Imaging in Neurodegeneration in Cologne (MINC): From Molecules to System Failure: A translational synopsis across the neurodegenerative disease spectrum, 18./19. Oktober 2018, Köln, Deutschland

2017

- Post J, Kogel V, Langen K-J, Willuweit A, Kutzsche J, Willbold D
Treatment of the SOD1*G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with an all-D-enantiomeric peptide
28th International Symposium on ALS/MND, 08.-10. Dezember 2017, Boston, Vereinigte Staaten von Amerika

- Post J, Kogel V, Willuweit A, Langen K-J, Kutzsche J, Willbold D
Treatment of the SOD1*G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with an all-D-enantiomeric peptide
Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases "Formation, aggregation and propagation of amyloids ", 27.-29. November 2017, Düsseldorf, Deutschland

Druckgenehmigung

3.1

A novel anti-inflammatory D-peptide inhibits disease phenotype progression in an ALS mouse model

Autoren: Post J, Kogel V, Schaffrath A, Lohmann P, Shah NJ, Langen K-J, Willuweit A, Willbold D and Kutzsche J

Journal: Molecules

Special Issue: Recent Advances in CNS Drug Discovery

Veröffentlichung 13. März 2021, MDPI Open Access

DOI: 10.3390/molecules26061590

Impact Factor: 3.267 (2019)