

Aus dem Institut für klinische Neuroimmunologie
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



***Analyse der strukturellen Plastizität von Interneuronen im
motorischen Kortex in einem Mausmodell der Amyotrophen
Lateralsklerose***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Georg Graf

aus

Dachau

Jahr

2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Sabine Liebscher

Zweites Gutachten: Prof. Dr. Nikolaus Plesnila

Drittes Gutachten: Prof. Dr. Peter Reilich

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2025

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	3
2	Zusammenfassung.....	5
3	Abstract (English).....	6
4	Einleitung	7
4.1	Amyotrophe Lateralsklerose.....	7
4.1.1	Das ZNS und der primär motorische Kortex.....	8
4.1.2	Klinik der ALS.....	9
4.1.2.1	Symptome.....	9
4.1.2.2	Therapie.....	10
4.1.3	Pathogenese.....	11
4.1.3.1	Risikofaktoren	11
4.1.3.2	SOD1	12
4.1.3.3	C9orf72	14
4.1.3.4	TARDBP und FUS	14
4.1.3.5	Anterograde vs. retrograde Ausbreitungshypothese.....	15
4.1.3.6	Synapsen – Funktion und strukturelle Plastizität.....	16
4.1.3.7	Kortikale Übererregbarkeit bei der ALS – Schaltkreismechanismen der MN Degeneration.....	19
4.1.3.8	Kortikale Interneuronen.....	21
4.1.3.9	Veränderungen von kortikalen Interneuronen bei der ALS	24
4.1.3.10	Interneuronen im motorischen Vorderhorn des Rückenmarks und ALS assoziierte Veränderungen	25
4.1.4	Stellenwert der Versuche	25
4.2	Zweiphotonenmikroskopie.....	26
4.2.1	Fluoreszenz.....	26
4.2.2	Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.....	27
4.2.3	Besonderheiten eines Zweiphotonenmikroskops	28
4.2.4	Transgene Mauslinie zur Markierung von Interneuronen	29
5	Fragestellung und Zielsetzung	30
6	Materialliste.....	31
7	Methodenteil	35
7.1	Mausmodell.....	35
7.2	Operativer Eingriff: Implantation eines kraniellen Fensters	36
7.3	Gitter-Häng-Test.....	37

7.4	Chronische <i>in vivo</i> Zweiphotonenmikroskopie.....	38
7.5	Bildanalyse der <i>in vivo</i> Zweiphotonenmikroskopie-aufnahmen	39
7.6	Immunohistochemie	41
7.7	Bildanalyse der Konfokalaufnahmen	42
7.8	Statistische Analyse	44
8	Ergebnisse	45
8.1	Klinisches Erscheinungsbild und Kraftausdauer des Mausmodells.....	45
8.1.1	SOD Mäuse zeigen ab 6 Monaten klinisch auffällige Motorik.....	45
8.1.2	SOD Tiere weisen altersabhängig eine Reduktion der Kraftausdauer auf.	46
8.2	Zelldichte der PV und SOM IN	48
8.2.1	Die PV IN Zelldichte ist nicht verändert.....	49
8.2.2	Die SOM IN Dichte ist altersabhängig reduziert	49
8.3	Strukturelle Plastizität der SOM IN während der Pathogenese der ALS	50
8.3.1	Interneurone in SOD Tieren weisen Veränderungen der Spine Dichte auf.	51
8.3.2	Boutons von SOM IN in SOD Tieren sind nicht verändert.....	54
9	Diskussion.....	56
9.1	<i>SOD1^{G93A}</i> (low copy) transgene Tiere phänotypisieren ALS Symptome.....	56
9.2	SOM und PV IN weisen ALS-assoziiert keine Dichteänderung auf	57
9.3	Spines und Boutons: Die Synapsen der SOM IN in der ALS.....	59
9.4	Generalisierbarkeit der Ergebnisse	61
10	Beiträge weiterer Wissenschaftler.....	63
11	Danksagung.....	63
12	Abkürzungsverzeichnis	64
13	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	66
14	Bibliographie	67
15	Eidesstattliche Versicherung.....	80
16	Übereinstimmungserklärung	81

2 Zusammenfassung

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine neurodegenerative Erkrankung der zentralen Motoneuronen. Die Patienten erleiden nach meist asymmetrischem Beginn an distalen Extremitäten einen progressiven Verlust der motorischen Fähigkeiten. Die Erkrankung führt innerhalb von etwa 5 Jahren zum Tod an meist respiratorischer Insuffizienz. Auch nach jahrzehntelanger Forschung konnte bis heute keine kurative Therapie gefunden werden. Dies liegt unter anderem an der noch nicht vollständig erschlossenen Pathogenese der Erkrankung. Es zeigen sich Hinweise auf eine kortikale Übererregbarkeit in Patienten, als auch Tiermodellen und ein gestörtes Exzitations-/ Inhibitionsgleichgewicht. Um die zellulären Mechanismen einer defizitären Hemmung zu entschlüsseln, untersuchten wir die Dichte und strukturelle synaptische Plastizität von Interneuronen (IN) im primär motorischen Kortex im *SOD1^{G93A}* transgenen Mausmodell der ALS in verschiedenen Krankheitsstadien. Dazu wurde neben immunhistochemischen Färbungen auch die chronische *in vivo* Zweiphotonenmikroskopie eingesetzt. Während sich eine signifikante altersabhängige Dichteminderung von Somatostatin (SOM) exprimierenden IN im motorischen Kortex nachweisen ließ, fanden sich keine Unterschiede in der Dichte von SOM IN bzw. Parvalbumin (PV) exprimierenden IN zwischen Wildtyp- und SOD transgenen Mäusen. Die Analyse synaptischer Strukturen auf SOM IN zeigte eine verringerte Dichte der postsynaptischen Korrelate (Dornen) an den Dendriten der SOM IN in präsymptomatischen SOD transgenen Tieren. Die dynamischen Parameter, Überlebensfraktion, Formations- und Verlustrate von dendritischen Dornen waren in SOD transgenen Tieren nicht verändert. Auch bei präsynaptischen Strukturen, den sogenannten Boutons, von SOM IN konnten keine signifikanten Veränderungen in SOD transgenen Tieren festgestellt werden. In der Zusammenschau der Ergebnisse konnten keine Hinweise auf eine Degeneration der SOM IN in SOD Tieren gefunden werden. Allerdings könnte es präsymptomatisch zu einem Funktionsdefizit von SOM IN aufgrund von reduziertem synaptischem Input kommen. Zukünftige Studien zur neuronalen Aktivität der IN könnten hierzu weiteren Aufschluss bringen.

3 Abstract (English)

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease affecting central motor neurons. Patients suffer a progressive loss of motor skills after an usually asymmetrical onset at the distal extremities. The disease leads to death within about 5 years typically from respiratory insufficiency. Even after decades of research, no curative therapy has yet been found. One of the reasons for this is that the pathogenesis of the disease is still incompletely understood. Cortical hyperexcitability in ALS patients as well as animal models is reported in sporadic and familial cases, can precede motor symptoms and scales with disease progression. Cortical hyperexcitability was shown to be based on a disturbed excitation/inhibition balance. To shed light on the mechanisms underlying deficient inhibition, we investigated the density and structural synaptic plasticity of interneurons in the primary motor cortex in a *SOD1^{G93A}* mouse model across disease stages, using immunohistochemistry and chronic *in vivo* two-photon microscopy. I found an age-related decrease in the density of somatostatin expressing interneurons (SOM IN), but overall no significant difference in the density of SOM IN or parvalbumin (PV IN) expressing interneurons between wildtype and SOD transgenic mice. When assessing synaptic structures, I observed a reduced density of dendritic spines (structural correlates of postsynapses) of SOM IN in presymptomatic SOD transgenic animals. The dynamic parameters, such as survival fraction, formation and elimination rate, however, were not different in SOD transgenic mice compared to wildtype controls. Assessment of the presynaptic axonal boutons of SOM IN did also not reveal any differences between SOD and wildtype mice. Taken together, I found no indication of a degeneration of SOM IN in SOD transgenic mice. However, an altered input to SOM IN as observed in the reduced density of dendritic spines in presymptomatic SOD mice could cause a functional deficit of SOM IN. Future work is needed to address this aspect by e.g. assessing neuronal activity of SOM IN to provide further insights into the pathogenesis cortical hyperexcitability in ALS.

4 Einleitung

4.1 Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine neurodegenerative Erkrankung der oberen und unteren Motoneuronen im zentralen Nervensystem (ZNS). Sie verdankt ihren Bekanntheitsgrad prominenten Patienten, wie z.B. dem preisgekrönten Physiker Stephen Hawking oder dem amerikanischen Baseballspieler Lou Gehrig, der viralen Ice-Bucket-Challenge der ALS Association 2014, aber nicht zuletzt auch dem Fakt, dass immer noch keine Heilung bzw. verlaufsmodifizierende Therapie existiert.

Bereits vor 150 Jahren benannte der französische Neurologe und Professor der Pathologie Jean-Martin Charcot als Erster das Syndrom Amyotrophe Lateralsklerose [Goetz, 2000]. Charcot postulierte, dass die Symptome, v.a. die Muskelschwäche und die Paralyse der Extremitäten, von dem Zelltod von motorischen Nervenzellen im zentralen Nervensystem herrührten. Der Pathologe fand dies durch Autopsien von verstorbenen Patienten heraus. In manchen Büchern wird deshalb diese Erkrankung nach seinem Erstbenenner auch „Charcot’s disease“ genannt.

Die chronische neurodegenerative Erkrankung ist auch unter einem anderen Namen v.a. in den USA bekannt: Lou Gehrig’s disease. Der namensgebende Baseballspieler schaffte es bis zu seinem 36. Geburtstag 1939 als Topspieler der New York Yankees in die Baseball Hall of Fame aufgenommen zu werden. Kurz darauf wurde bei dem Amerikaner ALS diagnostiziert, woran er zwei Jahre später starb [ALSAssociation].

Die nicht vollständig erforschte Pathologie der ALS mündet in einer progressiven Degeneration der zentralen Motoneuronen (MN): Schädigungen des oberen Motoneurons (engl. corticospinal motor neuron, CSMN) rufen spastische Lähmungen hervor, wohingegen Schädigungen der unteren Motoneuronen (engl. spinal motor neurons, SMN) zu schlaffen Paresen führen. Nach einem oftmals asymmetrischen Beginn in der distalen Extremitätenmuskulatur generalisieren die Paresen innerhalb von 2-4 Jahren nach proximal und münden terminal in einer respiratorischen Insuffizienz. Die ALS präsentiert sich als Erkrankung der Motorik, jedoch zeigte sich, dass 30-50% der Patienten auch eine Degeneration im Frontallappen, sowie kognitive, Wesens- und Verhaltensveränderungen aufweisen [Brown et al., 2017]. [Ludolph et al., 2021]

Die ALS wird in eine vererbare Form, familiäre ALS (fALS), und eine sporadisch auftretende Form (sALS) unterteilt [Zou et al., 2017]. Ungefähr jeder 10. Patient erkrankt an der hereditären Form der ALS [Brown et al., 2017, Fang et al., 2015, Renton et al., 2014]. Die Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt durchschnittlich 2-4 Lebensjahre, bevor die Patienten an respiratorischer Insuffizienz sterben [Ludolph et al., 2021]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 58-63 Jahren für die sporadische Variante bzw. 40-63 Jahren bei Patienten mit genetischer Ursache; Männer sind 1,2-1,6 mal häufiger betroffen als Frauen [Fang et al., 2015]. Der Erkrankung wird in Europa eine Inzidenz von 2-4/100.000 Menschen pro Jahr und einer Prävalenz von 4-8 pro 100.000 zugeordnet [Longinetti et al., 2019, Ludolph et al., 2021].

Bevor die Klinik der ALS behandelt wird, soll im Folgenden die Neurohistologie und -anatomie auszugsweise näher beleuchtet werden, um die Pathogenese der neurodegenerativen Erkrankung, obwohl noch nicht vollständig verstanden, darlegen zu können.

4.1.1 Das ZNS und der primär motorische Kortex

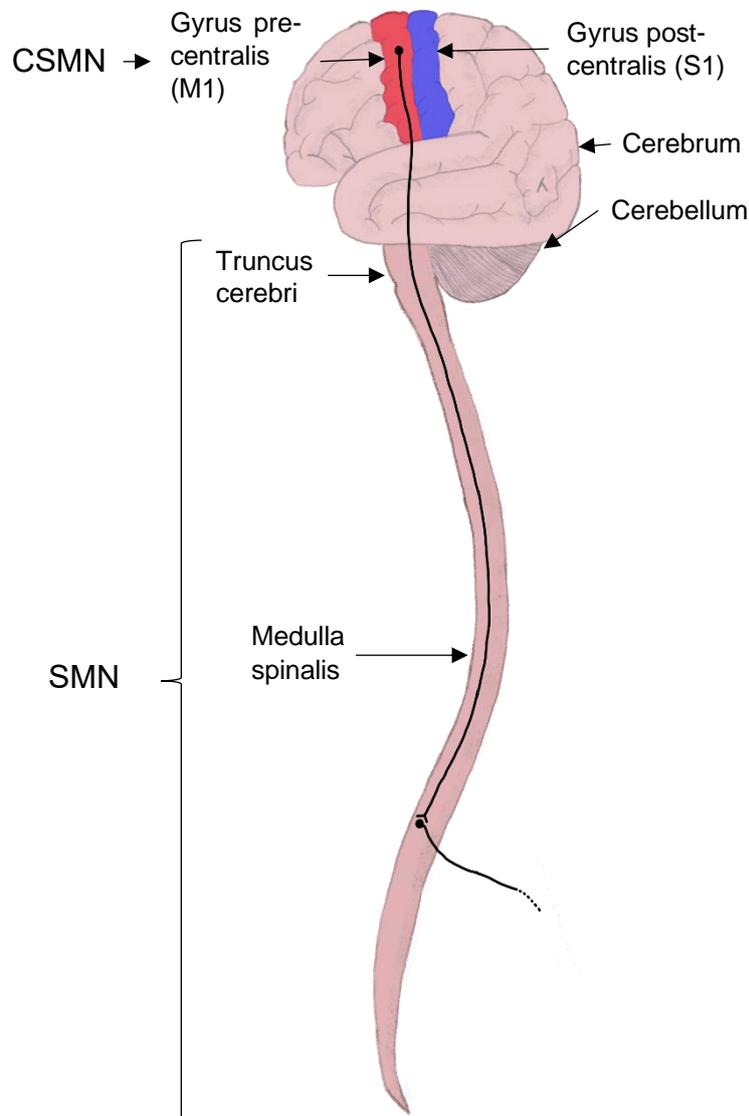


Abb. 1: MN im ZNS

Im Gyrus postcentralis befindet sich der somatosensorische Kortex (S1), im Gyrus precentralis der primärmotorische Kortex (M1). Die Axone der CSMN in M1 ziehen entweder zu den SMN in den motorischen Nervenkernen im Truncus cerebri oder bilden den Tractus pyramidalis und ziehen zu den SMN in der Medulla spinalis. Die Axone der SMN auf spinaler Ebene bilden die peripheren Spinalnerven. Ein beispielhafter Verlauf einer MN Verschaltung ist abgebildet. M1: primärmotorischer Kortex, S1: somatosensorische Kortex, CSMN: obere Motoneurone, SMN: untere Motoneurone [Mense, 2020, Rettig, 2021]

Motorneuronen sind eingebettet in komplexe und fein regulierte neuronale Schaltkreise, welchen gezielt den Informationsfluss steuern. Der primär motorische Kortex (M1), das Zentrum der Willkürmotorik, befindet sich im Gyrus precentralis und ist somatotop geordnet. Somatotopie bezeichnet die topographische Anordnung CSMN je nach Innervation der Muskelgruppen, wobei benachbarte Körperbereiche von benachbarten MN innerviert werden. Die Anzahl der Neuronen korreliert mit dem

Grad der Feinmotorik. M1 beherbergt die CSMN, welche den kortikalen Bewegungsbefehl an SMN im Rückenmark senden (siehe Abb. 1). Hierfür werden hirnweite Informationen integriert und verarbeitet. M1 erhält Signale aus dem prämotorischen und dem somatosensorischen (S1) Kortex, außerdem aus dem okzipital gelegenen Augenfeld und dem motorischen Sprachzentrum. V.a. für komplexe Feinmotorik erhält M1 Input aus dem Kleinhirn, den Basalganglien und dem Thalamus. Modulierend wirken Axone aus dem dorsalen Raphekern, dem Locus coeruleus, den Tuberomammillärkernen und auch aus dem Vorderlappen [Brunet et al., 2020, Gu, 2002]. Es gibt Hinweise, dass der dorsale Raphekern einen inhibierenden Einfluss auf die CSMN ausüben; die anderen o.g. Neuronenpopulationen können das motorische Netzwerk in beide Richtungen modulieren [Brunet et al., 2020]. Histologisch entspricht M1 dem agranulären Neokortex: sechsschichtiger Isokortex mit schwach ausgebildeten Laminae granulares interna und externa, Schichten L2 und L4, und ausgeprägten Laminae pyramidales interna und externa, also L3 und L5. L1 ist eine zellarme Schicht, welche v.a. durch Axone und Dendriten gebildet wird. In Schicht L3 und L5 befinden sich die meisten CSMN. Die klassischen Betz'schen Riesenzellen befinden sich in L5b, jedoch soll hier betont werden, dass die CSMN nicht nur die Betz-Zellen umfassen, sondern noch andere, etwas weniger prominente MN im M1. L1 besteht vorwiegend aus Dendriten und ist die Soma-ärmste Schicht. [Kipp et al., 2022, Mense, 2020, Rettig, 2021]

Kortikale CSMN bestehen aus einem Soma in tieferen Schichten, meist L5, mehreren apikalen Dendriten, welche bis zur L1 reichen, aber auch basalen Dendriten in tieferen Schichten, und einem Axon [Gunes et al., 2020, Harris et al., 2015], welches als Teil der Pyramidenbahn ins Rückenmark projiziert.

4.1.2 Klinik der ALS

4.1.2.1 Symptome

Maßgeblich für die Diagnose sind auch 150 Jahre nach der Entdeckung der Krankheit die Degenerationszeichen von CSMN und SMN.

Bei Schäden der CSMN treten neben einer Hyperreflexie auch pathologische Reflexe, wie z.B. der Babinskireflex, auf. Spastiken, d.h. eine Tonuserhöhung der Muskulatur mit fakultativen, nicht funktionellen Haltungsmustern, treten additiv auf.

Als Zeichen der SMN-Degeneration treten initial Krämpfe und Faszikulationen auf. Durch die fehlenden Aktionspotentiale (AP) an den motorischen Endplatten unterbleiben Kontraktionen, was eine schlaaffe Parese und im späteren Verlauf eine Muskelatrophie bedingt. Auch eine Hyporeflexie erklärt sich durch den Zelltod der SMN; diese kann final in einer Areflexie münden.

Je nach Lokalisation der neurodegenerativen Prozesse sind gemäß der Somatotopie andere Muskelgruppen betroffen. Der klassische Beginn bei 58% – 80% der Patienten ist ein asymmetrischer, distal gelegener Fokus an einer Extremität, meist charakterisiert durch einen Kraftverlust bzw. eine Ungeschicklichkeit einer Hand oder eine Gangunsicherheit und Schwäche eines Beins [Longinetti et al., 2019]. Dies bezeichnet man als spinalen Beginn. Etwa ein Fünftel der Patienten berichtet von

einem sog. bulbären Beginn bedingt durch die Degeneration von MN im Hirnstamm: Sie klagen über Dysarthrie, Dysphagie und Hypersalivation [Longinetti et al., 2019]. Patienten mit diesem Beginn haben eine schlechtere Prognose als ALS Erkrankte mit spinalem Beginn [Miller et al., 2012]. Ca. 5% der Patienten weisen zusätzlich eine frontotemporale Demenz (FTD) auf [Ludolph et al., 2021, Lulé et al., 2018]. Die Anzahl der Patienten mit milderer kognitiven bzw. Verhaltensstörungen beträgt sogar 50% oder mehr [Giordana et al., 2011, Lulé et al., 2018]. 1945 wurde eine endemische Form der ALS auf der westpazifischen Insel Guam mit parkinsonoiden Symptomen entdeckt [Koerner, 1952].

Der Kraftverlust der quergestreiften Muskulatur führt zu einer respiratorischen Insuffizienz. Durch das Erlahmen der Atemmuskulatur bzw. Atemhilfsmuskulatur werden nicht mehr alle Lungenalveolen ausreichend belüftet. Die aus der alveolären Hypoventilation resultierende Hypoxie verschlechtert sich mit der Progression der Erkrankung zunehmend und mündet schlussendlich in einer terminalen respiratorischen Insuffizienz. Die alveoläre Hypoventilation zieht ein erhöhtes Pneumonierisiko nach sich, bedingt durch die unbelüfteten, mit mukösem Sekret gefüllten Alveolen [Ludolph et al., 2021]. Besonders fatal sind Lungenarterienembolien aufgrund eines durch die Paresen bedingten erhöhten Thromboserisikos.

4.1.2.2 Therapie

Die Basistherapie der ALS besteht in Deutschland aus Riluzol. Die Wirkung ist krankheitsmodifizierend: Die Aggravation der Symptome wird verlangsamt und verlängert das mittlere Überleben der erkrankten Patienten um 2-3 Monate [Miller et al., 2012]. Riluzol wirkt als Glutamat-Antagonist inhibierend auf die Freisetzung des erregenden Neurotransmitters [Jaiswal, 2017] und verlangsamt die Neurodegeneration. Als treibender Faktor der Degeneration von Pyramidenzellen (PZ) im Rahmen der ALS wird eine Übererregbarkeit dieser Neuronen diskutiert [Brunet et al., 2020, Do-Ha et al., 2018, Eisen et al., 2017, Gunes et al., 2020, Shepherd, 2013].

Ein neuartiges, vielversprechendes Medikament ist Toferson, ein Antisense Oligonukleotid welches darauf abzielt die mRNA der Superoxiddismutase1 (SOD1, siehe 4.1.3) zu degradieren. Toferson wurde entwickelt für fALS basierend auf Mutationen im *SOD1* Gen. Die intrathekale Applikation reduzierte in SOD ALS Patienten die Neurofilament- Leichtketten Konzentration [Miller et al., 2022], konnte in einer verlängerten Open label extension Phase der Studie auch die Symptomprogression verlangsamen und sogar teilweise zu einer Verbesserung der Symptome führen [Smith et al., 2025]. Eine Zulassung besteht in Amerika und durch die europäische Arzneimittel Agentur.

Ergänzend werden palliativ Krankengymnastik, Ergotherapie, Logopädie, Psychotherapie, Ernährung via perkutaner endoskopischer Gastrostomie, eine präventive Antibiose gegen Pneumonien und Heimsauerstoff bzw. nicht invasive Ventilation und final Tracheostomata zur Atemwegssicherung angewandt [Ludolph et al., 2021].

4.1.3 Pathogenese

Die Entstehung der neurodegenerativen Erkrankung ALS ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt. Aktuelle Erkenntnisse beruhen überwiegend auf Zell- und Tiermodellen mit ALS assoziierten genetischen Mutationen. Mithilfe dieser Modelle wurde eine Vielzahl von gestörten intrazellulären Prozessen bei der ALS aufgedeckt. Intrazelluläre Proteinaggregation aufgrund von Fehlfaltung und/ oder zytosolischer Fehllokalisierung intranukleärer Proteine [Blokhuis et al., 2013, Tyzack et al., 2019], fehlregulierter Ribonukleinsäure (RNA) Prozessierung [Polymenidou et al., 2012], gestörte Kalziumionen (Ca^{2+}) Homöostase [Leal et al., 2015], gestörte Funktion der Mitochondrien [Kawamata et al., 2010] und defizitärer axonaler Transport [Marinković et al., 2012]. Als weitere Faktoren für den Untergang der MN werden oxidativer Stress [Barber et al., 2010] und Hypererregbarkeit bzw. Glutamat vermittelte Exzitotoxizität diskutiert [Brunet et al., 2020, Do-Ha et al., 2018, Eisen et al., 2017, Gunes et al., 2020, Shepherd, 2013].

Die Ätiologie der ALS ist multifaktoriell und teilweise durch genetische Mutationen und deren Folgen bedingt. Alle bisher identifizierten Gene und genetischen Varianten, die mit ALS in Verbindung gebracht werden konnten, werden von der Amyotrophic Lateral Sclerosis online Database ALSoD [ALSoD] aufgelistet. Im Folgenden werden die wichtigsten bisher bekannten Risikofaktoren und Genmutationen kurz vorgestellt. (siehe Abb. 2).

4.1.3.1 Risikofaktoren

Die Bestimmung der Risikofaktoren ist noch immer Gegenstand der Forschung und nur wenige sind ubiquitär anerkannt. Zwei der sicher identifizierten Risikofaktoren sind ein Alter über 50 Jahren und eine Angehörigkeit zum männlichen Geschlecht. Aufgrund der hereditären Form fALS ist auch eine Verwandtschaft 1. Grades mit einem ALS Patienten bzw. der zusätzliche Nachweis von einem oder mehreren mit ALS in Verbindung gebrachten Genmutationen [ALSoD] mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Hinweis auf ein erhöhtes Risiko an ALS zu erkranken. [Armon, 2003]

Auch umweltbezogene Faktoren werden diskutiert. Virusinfektionen mit z.B. HIV [Bellmann et al., 2019, Satin et al., 2021], Enteroviren [Xue et al., 2018] oder Tollwut- und Zikaviren [Bellmann et al., 2019] scheinen den Phänotyp der ALS Erkrankung in Stammzellen zu verstärken, ob sie jedoch die Erkrankung auslösen können, ist umstritten. Des Weiteren wird wiederholte traumatische Gehirnerschütterung, wie z.B. im Kampfsport oder anderen Kontaktsportarten, als Risikofaktor diskutiert [Liu et al., 2021]. Auch übermäßige sportliche Betätigung wird mit der Entstehung von ALS in Verbindung gebracht [Julian et al., 2021]. Es gibt Hinweise auf eine mögliche Risikoerhöhung durch Kontakte mit Metallen und Toxine wie z.B. Pestizide [Fang et al., 2015]. Ein positiver Effekt von einer Ernährung mit erhöhten Mengen an ungesättigten Fettsäuren bzw. Antioxidanzien wie Vitamin E wird bei widersprüchlicher Studienlage nicht angenommen [Fang et al., 2015]. Eine solche Diät und auch ein hoch normaler engl. body mass index (BMI) sind eher nach Diagnosestellung als protektiv einzuschätzen [Fang et al., 2015, Ludolph et al., 2021].

Die folgenden etablierten Genmutationen sind Gegenstand intensiver Forschung: Superoxiddismutase 1 (*SOD1*), engl. chromosome 9 open reading frame 72 (*C9orf72*),

TAR Desoxyribonucleinsäure (DNA) bindendes Protein (*TARDBP*) und engl. fused in sarcoma (*FUS*).

4.1.3.2 SOD1

Das 1993 erstmalig mit ALS in Verbindung gebrachte Gen [Rosen et al., 1993] kodiert die kupfer- bzw. zinkabhängige SOD1, welche ubiquitär im Zytoplasma exprimiert wird. Ihre primäre Funktion ist das Umsetzen von hochreaktiven Radikalen und Hyperoxiden zu Sauerstoff und Peroxid. 15% aller fALS Patienten in Europa weisen mutiertes *SOD1* auf [Zou et al., 2017].

Es wurden viele verschiedene Mutationen im *SOD1* Gen identifiziert, manche auch mit unveränderter Dismutase Aktivität [Bruijn et al., 1998]. Diese Variabilität der hauptsächlich katalysierten Reaktion hat jedoch keinen Einfluss auf den Beginn der Symptome oder das Fortschreiten der Beschwerden [Cleveland et al., 1995]. Daraus folgt, dass die Pathogenese von anderen toxischen Eigenschaften des Proteinkomplexes vorangetrieben wird [Bruijn et al., 1998]. Bruijn et al. zeigten außerdem 1997, dass fehlerhaft gefaltete SOD1 Proteine im Zytoplasma der MN akkumulieren und ubiquitinierte Komplexe bilden [Bruijn et al., 1997]. Diese Komplexbildung steigt auch mit dem Fortschreiten der Erkrankung an, jedoch konnte durch eine Elimination dieser Komplexe weder der Ausbruch noch das Fortschreiten der Symptome aufgehalten werden [Parone et al., 2013]. Des Weiteren konnte eine Prionen ähnliche Ausbreitung beobachtet werden: Fehlgefaltete Proteine beeinflussen Wildtyp Proteinketten und zwingen diese ebenfalls in eine Fehlfaltung nicht nur intrazellulär, sondern auch auf transzellulärem Weg über die extrazelluläre Matrix via Pinocytose [Münc et al., 2011]. Die Expression von veränderten SOD1 Proteinen in allen MN führt nicht automatisch zu einem früheren Krankheitsbeginn bei transgenen Mäusen [Yamanaka et al., 2008]. Je weniger Gliazellen und andere, nicht motorische Neuronen betroffen sind, desto später konnte ein Symptombeginn beobachtet werden und desto langsamer eskalierte die Symptomprogression [Yamanaka et al., 2008]. Eine Zelltyp selektive genetische Deletion von mutierter SOD in Mäusen durch das Cre/lox Verfahren lässt schlussfolgern, dass die Expression in MN maßgeblich den Erkrankungsbeginn determiniert, während die Expression in Mikrogliazellen vor allem das Fortschreiten der Erkrankung beschleunigt [Boillee et al., 2006].

Mutierte SOD beeinträchtigt zudem den Proteinabbau in der Zelle. Zum einen hemmt es direkt den Proteinabbau durch das Proteasom [Kabashi et al., 2004, Nishitoh et al., 2008]. Zum anderen bindet SOD direkt an ein integrales Protein in der Membran des Endoplasmatischen Retikulum (ER): Derlin-1 [Nishitoh et al., 2008]. Diese Bindung führt zur Hemmung der ER assoziierten Degradation (ERAD), welches schon im ER fehlgefaltete Proteine erkennt und eliminiert. Wenn durch die Gabe von Salubrial die „ungefaltete Protein Antwort“ und damit die ER Stress induzierte Apoptose verhindert wird [Boyce et al., 2005], verzögert sich das Fortschreiten der ALS-spezifischen Symptome [Saxena et al., 2009]. In Mäusen, die mutierte SOD1 exprimieren, konnte zusätzlich eine verringerte Proteasomaktivität vor dem Einsetzen des klinischen Erscheinungsbildes der Erkrankung nachgewiesen werden [Kabashi et al., 2004].

Mutierte SOD beeinträchtigt weiterhin das Zellskelett der MN. CSMN, welche die Pyramidenbahn bilden, besitzen ein Axon mit bis zu einem Meter Länge. Sowohl anterograder als auch retrograder Transport ist lange vor dem Einsetzen der Degeneration der MN im Mausmodell verlangsamt [Perlson et al., 2009, Williamson et al., 1999].

Die zytosolischen SOD Proteinkomplexe finden sich nicht nur in MN, sondern auch in Gliazellen des ZNS: Mikroglia sind hirnständige Zellen des Immunsystems. Boillee et al. zeigten 2006 [Boillee et al., 2006], dass mutierte SOD1 in Mikrogliazellen von transgenen Mäusen die Symptomentwicklung beschleunigt. Die SOD1 Proteine mit fehlerhafter Struktur binden an die Guanosintriphosphatase (GTPase) RAC1, welche wiederum einen Proteinkomplex kontrolliert, der extrazellulär Superoxide produziert [Harrasz et al., 2008]. Superoxide sind, wie oben beschrieben, hochreaktiv und führen v.a. in lokaler, hoher Konzentration zu Zellschäden. Oligodendrozyten bilden im ZNS die lipidreichen Myelinscheiden, welche essenziell für die Signalübertragung v.a. über weite Distanzen sind. Wird in einem SOD transgenen Mausmodell selektiv in Oligodendrozyten die Expression von mutierter SOD1 mit Hilfe des Cre/lox- Systems unterdrückt, verzögert sich der Zeitpunkt des Erkrankungsausbruchs signifikant [Kang et al., 2013]. Oligodendrozyten unterstützen MN auch mit Energie in Form des Metaboliten Laktat. Mutierte SOD1 führt ebenfalls zu einer verringerten Expression des Laktattransporters in Oligodendrozyten [Lee et al., 2012]. Astrozyten leisten ebenfalls metabolische Unterstützung im ZNS. Sie sind auch für die Homöostase des Neurotransmitters Glutamat im synaptischen Spalt zuständig. Die selektive Hemmung der Expression mutierter SOD1 in Astrozyten in einem SOD transgenen Mausmodell führte zu einem späteren Krankheitsbeginn und verlangsamte das Fortschreiten der Symptome [Wang et al., 2011]. Der Transporter, der Glutamat aus dem synaptischen Spalt befördert, wird bei Astrozyten mit mutierter SOD Expression weniger stark exprimiert [Howland et al., 2002]. Wildtyp Astrozyten wirken protektiv gegen eine Übererregung der betroffenen MN und damit Exzitotoxizität [Gunes et al., 2020, Howland et al., 2002, Van Damme et al., 2007]. Eine toxische Rolle wurde Astrozyten zugeschrieben, als in einer *in vitro* Kultur von humanen, aus pluripotenten Stammzellen induzierten Astrozyten von ALS-Patienten und humaner, nicht erkrankter MN der Zelltod letzterer beobachtet wurde [Haidet-Phillips et al., 2011]. Im Gegensatz dazu hatte die Implantation von gesunden Astrozytenvorstufen ohne SOD1 Mutation ins Rückenmark von transgenen Mäusen einen protektiven Einfluss und verlängerte den Zeitraum bis zum Symptombeginn [Lepore et al., 2008].

30 Jahre nach der Erstbeschreibung einer ALS assoziierten SOD1 Mutation konnte mit dem Antisense Oligonukleotid Toferson ein therapeutischer Durchbruch erzielt werden: Durch intrathekale Gabe des Medikaments wird der weitere Krankheitsfortschritt von ALS Patienten mit einer SOD1 Mutation verlangsamt [Miller et al., 2022]. Das Molekül vermittelt eine RNase abhängige Degradation der SOD1-mRNA (engl. messenger ribonucleic acid) und verringert so die Synthese des SOD1 Enzyms. [Mccampbell et al., 2018, Miller et al., 2020, Smith et al., 2025]

4.1.3.3 C9orf72

C9orf72 bezeichnet einen Locus auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9: dem Band 21 des kurzen Arms. Physiologischerweise findet man hier bis zu 23 intronische, also nichtkodierende, Hexanukleotid Wiederholungen der Basenfolge GGGGCC. Im pathologisch veränderten Genom sind hunderte bzw. tausende dieser Hexanukleotidsequenzen vorhanden [DeJesus-Hernandez et al., 2011]. *C9orf72* konnte bei etwa 33% aller fALS Patienten in Europa nachgewiesen werden [Zou et al., 2017]. Diese Mutation wird nicht nur mit Fällen der ALS, sondern auch der FTD in Verbindung gebracht [DeJesus-Hernandez et al., 2011], einem Krankheitsbild, bei dem neurodegenerative Prozesse im Frontal- und Temporalkortex zu Wesensveränderungen, Gedächtnis- und Sprachstörungen bzw. Inkontinenz führen. Bei 15 – 20% aller ALS Patienten wird ebenfalls eine FTD diagnostiziert, wobei die Dunkelziffer höher angenommen wird [Brown et al., 2017]. Die Funktion des Genabschnitts ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch wurde beobachtet, dass eine verminderte Expression von *C9orf72* die Autophagieprozesse der Neuronen supprimiert [Webster et al., 2016].

Ein Knockout des *C9orf72* Gens in Neuronen und Gliazellen führte zu keinerlei Veränderungen im Phänotyp eines Mausmodells [Koppers et al., 2015], bei einer ubiquitären Elimination hingegen zeigten sich Splenomegalie und Lymphadenopathie, abnormale Makrophagen- und Mikrogliafunktion als auch altersabhängige Entzündungen im ZNS [Atanasio et al., 2016].

Auf der anderen Seite wird auch ein toxischer ‚Funktionsgewinn‘ diskutiert: C9-ALS-FTD Patienten wiesen akkumulierte RNA mit GGGGCC Hexanukleotidwiederholungen im ZNS auf [DeJesus-Hernandez et al., 2011], welche wiederum RNA bindende Proteine sequestrieren. Dies führt zu Defekten im Spleißen der prä-mRNA [La Spada et al., 2010].

Zusätzlich können Hexanukleotidwiederholungs- assoziierte nicht-AUG Translationen (engl. repeat-associated non-AUG; RAN), also Translationen von mRNA in Proteine ohne Beteiligung eines Startkodons bestehend aus Adenosin, Uracil und Guanosin [Zu et al., 2011], zur Expressierung von Proteinen führen, die aus Wiederholungen von Dipeptiden bestehen. Diese engl. dipeptide repeats (DPR) Proteine bestehen entweder aus Glycin-Alanin, Glycin-Arginin, Glycin-Prolin oder bei Antisense-Transkription Prolin-Arginin und Prolin-Alanin Peptidwiederholungen [Mori et al., 2013]. Arginin beinhaltende DPR führen zu fatalen Zellschäden [Kwon et al., 2014]. Zusätzlich gibt es Hinweise auf einen gestörten Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma. Die GGGGCC Wiederholungen beeinflussen auch die Morphologie der Zellkernmembran und vor allem ihrer Poren, durch die besagter Transport geschieht [Jovičić et al., 2015].

4.1.3.4 TARDBP und FUS

TARDBP und *FUS* sind Gene, welche für RNA bindende Proteine kodieren. Physiologisch kommt TDP-43, das Protein, für welches *TARDBP* kodiert, im Zellkern vor [Neumann et al., 2006], ebenso wie *FUS* [Tyzack et al., 2019]. Diese Proteine werden bei der ALS jeweils ins Zytosol mislokalisiert, ubiquitiniert und aggregieren [Blokhuis et al., 2013]. Zusammen mit anderen mislokalisierten RNA bindenden

Proteinen bilden sie membranlose Organellen, welche v.a. durch aberrante Phasentrennung entstehen [Molliex et al., 2015]. Dieser Prozess basiert auf einem stark erhöhten Konzentrationsanstieg im Zytosol und kann zur amyloidogenen Fibrillenbildung führen [Molliex et al., 2015]. Mutationen in *TARDBP* wurden bei 4% und in *FUS* bei 3% aller europäischen fALS Erkrankungen nachgewiesen [Zou et al., 2017]. Interessant ist die Erkenntnis, dass Oligodendrozyten, die Kontakte zu Axonen ausbilden, im Gegensatz zu denjenigen, die als Satellitenzellen Soma-nah lokalisiert sind, auch TDP-43 Inklusionen aufweisen [Brettschneider et al., 2013].

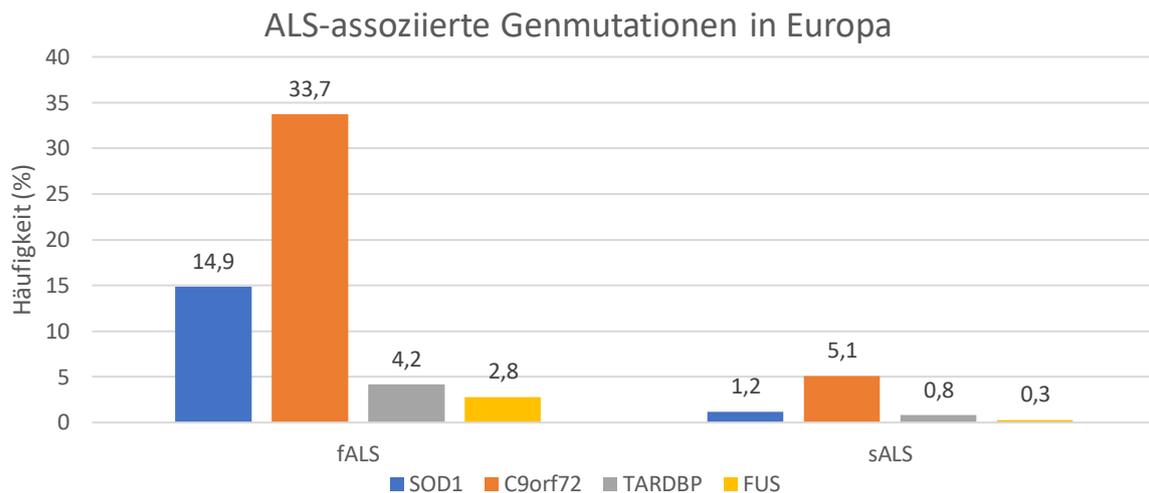


Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der ALS-assoziierten genetischen Mutationen in Europa [Zou et al., 2017]

4.1.3.5 Anterograde vs. retrograde Ausbreitungshypothese

Da sowohl CSMN als auch SMN betroffen sind, stellt sich die Frage, ob eine der beiden Zellpopulationen kausal an der Degeneration der anderen beteiligt ist oder ob beide Prozesse unabhängig voneinander ablaufen. Die anterograde (engl. dying forward) Hypothese besagt, dass CSMN zuerst betroffen sind und SMN erst sekundär degenerieren. Wenn zuerst SMN sterben und CSMN danach betroffen sind, würde die sog. retrograde (engl. dying back) Hypothese zutreffen.

Für den anterograden Verlauf spricht, dass die SMN der Okulomotorik und des Onuf Nukleus, welcher die Kontinenz des Rektums und der Harnblase als auch die Orgasmusfähigkeit steuert, am spätesten degenerieren bzw. Symptome zeigen [Braak et al., 2013, Eisen et al., 2017]. Es wird argumentiert, dass die extrinsische Okulomotorik und Viszeromotorik keine direkten corticospinalen bzw. -bulbären Signale empfangen [Baker, 2014, Braak et al., 2013, Eisen, 2021, Eisen et al., 2017]: Die Hirnnerven III, IV und VI werden via dem medialen longitudinalen Faszikel gesteuert [Horn et al., 2011]. Visceromotoneuronen erhalten ihren Input aus dem Hirnstamm [Braak et al., 2013]. Die oben erwähnten TDP-43 Proteinaggregate folgen einem ebenfalls anterograden Verteilungsmuster [Braak et al., 2013, Brettschneider et al., 2013]. Eine weitere Erkenntnis, die für die dying forward Hypothese sprechen könnte, ist, dass die langen corticospinalen und -bulbären Axone frei von Proteininklusionen sind [Braak et al., 2013, Eisen et al., 2017]. Die Proteinaggregate könnten nicht nur ein Ausdruck fehlerhafter Proteinbiosynthese, sondern auch eine Schutzreaktion gegen die zytotoxischen Eigenschaften der Proteine in gelöster Form

sein [Braak et al., 2013, Eisen, 2021]. Baker argumentiert, dass Axone dieser überproportionalen Länge eine schlechtere Lysosomenfunktion an der Präsynapse gewährleisten können [Baker, 2014, Raveendra et al., 2013]. Diese Art von Neuron zu Neuron Verbreitung wurde schon für andere neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson postuliert [Iba et al., 2013, Wu et al., 2013].

Die retrograde Pathophysiologie wird durch Versuche am *SOD1^{G93A}* Mausmodell unterstützt: Fischer et al. zeigten, dass SMN, die Axone der motorischen, vorderen Nervenwurzel und neuromuskuläre Endplatten zugrunde gehen, bevor CSMN degenerieren [Fischer et al., 2004]. Autopsieergebnisse eines sALS Patienten konnten diese Ergebnisse replizieren [Fischer et al., 2004]. Distale Axone degenerieren also vor dem neuronalen Zelltod und dem Auftreten von Symptomen. Auch kommen Fischer et al. zu der Erkenntnis, dass die Länge und Dicke des Axons Risikofaktoren in der Pathophysiologie der ALS darstellen: Je dicker bzw. länger die Axone sind, desto früher zeigen sie Zeichen von Degeneration [Fischer et al., 2004].

Beide Hypothesen haben jeweils stichhaltige Argumente. Folglich versucht Baker beide Pathophysiologien in seinem dying outward Modell miteinander zu vereinbaren [Baker, 2014].

Teil der Erforschung der neuronalen Netzwerke ist die Untersuchung der neuronalen Kontakte, hier den Synapsen zwischen MN und Interneuronen (IN).

4.1.3.6 Synapsen – Funktion und strukturelle Plastizität

Synapsen sind neuronale Kontaktstellen, welche interzelluläre Kommunikation im Nervensystem ermöglichen. Es gibt axo-dendritische, axo-axonale, dendri-dendritische und perisomatische Synapsen. Ihre Struktur ist in drei Bereiche unterteilt: Die Präsynapse der sendenden Nervenzelle, den synaptischen Spalt und die Postsynapse der Zielzelle/n (siehe Abb. 3). Die Übertragung eines elektrischen Potentials geschieht indirekt mit Hilfe von Neurotransmittern und membranständigen Rezeptoren.

Die Neurotransmitter, z.B. exzitatorisches Glutamat oder inhibitorisch wirksame γ -Aminobuttersäure (GABA), werden im Zellkörper gebildet und in Vesikeln via Zellskelett ins Axon und in die Präsynapse transportiert. Bei einem AP verschmelzen diese Vesikel mit der Membran und der Neurotransmitter wird exozytotisch in den synaptischen Spalt freigesetzt. Hier binden die Moleküle an Rezeptoren der Postsynapse und lösen dort über Öffnung von membranständigen Kanälen oder Aktivierung von ebenfalls membranständigen Transportern bei Überschreiten des Schwellenpotentials ein neues AP aus. Im Beispiel von Glutamat wären dies die ionotropen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), Kainat und α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionsäure (AMPA) und die metabotropen mGluR (engl. metabotropic glutamate receptor) Rezeptoren [Suha et al., 2018, Traynelis et al., 2010]. Je nach Affinität des Neurotransmitter- Rezeptor- Komplexes löst sich der Neurotransmitter. Glutamat wird im synaptischen Spalt von keinem Enzym gespalten bzw. deaktiviert. Um den Ruhegradienten des Neurotransmitters im synaptischen Spalt wieder zu erreichen, wird der Neurotransmitter zu kleinem Teil via Diffusion, aber auch durch

Transporter in den Membranen der Neuronen und Astrozyten in besagte Zellen aufgenommen. Dort wird Glutamat entweder als Neurotransmitter wiederverwendet oder metabolisiert und als Energielieferant oder zur Proteinproduktion weiterverarbeitet. Die wichtigsten Transporter für die zelluläre Glutamat Aufnahme sind die EAAT (engl. excitatory amino acid transporter). [Danbolt, 2001]

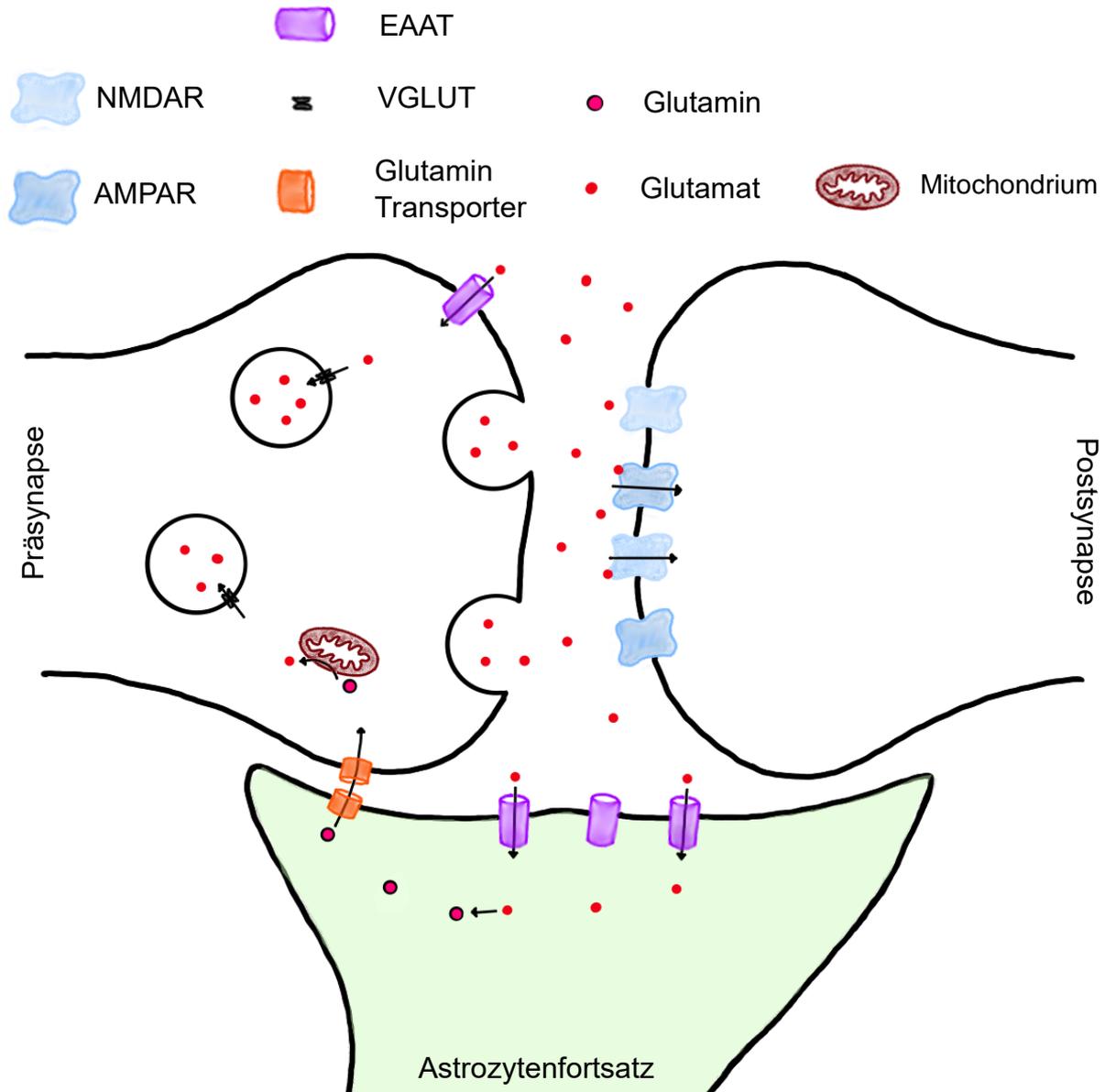


Abb. 3: Glutamatwiederaufnahme an der Synapse

Nach Ankunft eines AP in der Präsynapse wird Glu via Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt. Dort bindet es an postsynaptische Rezeptoren, wie z.B. die ionotropen AMPAR oder NMDAR. Freies Glu wird entweder direkt über EAAT3 bzw. 4 in die Präsynapse wiederaufgenommen oder von Astrozyten mit Hilfe von EAAT1 bzw. 2 aus dem Spalt eliminiert. In der Gliazelle wird der Glutamat-Glutamin-Zyklus fortgesetzt: ATP abhängig wird Glu in das weniger zytotoxische Glutamin umgesetzt, mit Transportern in das präsynaptische Neuron überführt und dort von Mitochondrien wieder zu Glu katalysiert. In der Präsynapse wird freies Glu durch VGLUT in Vesikel gespeichert und die Ausschüttung für das nächste AP vorbereitet. AMPAR: α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionsäure Rezeptor, AP: Aktionspotential, ATP: Adenosintriphosphat, EAAT: engl. excitatory amino acid transporter, Glu: Glutamat, NMDAR: N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor, VGLUT: engl. vesicular glutamate transporter [Danbolt, 2001]

Die strukturellen Korrelate von exzitatorischen postsynaptischen Elementen auf Dendriten nennt man Dornen (engl. spines). Strukturelle Korrelate von Präsynapsen auf Axonen werden als Knöpfchen (engl. boutons) bezeichnet und sind mikroskopisch

mit Hilfe von Fluorophoren oder Färbungen darstellbar. Im weiteren Verlauf werden die gebräuchlicheren englischen Fachbegriffe als Fremdwörter verwendet. Die Spines sind ca. einen Mikrometer groß: im adulten Gehirn maximal 3µm lang, mit einem etwa 0,5µm dicken Hals und 0,5-1,5µm Kopfdurchmesser [Phillips et al., 2015]. Man benötigt eine enorme Auflösung um diese Strukturen zu untersuchen. Morphologisch kann man die Spines in vier verschiedene Typen unterteilen: Pilzförmige, stummelförmige, dünne Spines und Filopodien [Jones et al., 1969]. Je dünner, desto instabiler sind sie. Matsuzaki et al. konnten zeigen, dass Größe und Form der Spines abhängig von der individuellen synaptischen Aktivität sind [Matsuzaki et al., 2004]. Spines weisen eine komplexe ultrastrukturelle Zytoarchitektur auf, die es ermöglicht innerhalb von einigen Stunden bis zu einem Tag [Holtmaat et al., 2009b] ihre Erscheinung an die funktionellen Ansprüche anzupassen. Verschiedene Nervenzellen in unterschiedlichen Hirnarealen weisen spezifische Spinedichten auf [Holtmaat et al., 2005]. Es zeigte sich, dass PZ übergeordneter Hirnareale, wie der die Kognition beherbergende präfrontale Kortex, nicht nur mehr Synapsen, sondern auch mehr Spines bilden als z.B. PZ des visuellen Kortex [Elston, 2003, Jacobs, 2001]. [Chidambarama et al., 2019]

Von morphologischen auf funktionelle Charakteristika zu schließen, ist umstritten, jedoch geht man davon aus, dass häufig genutzte Synapsen größer werden und zusätzliche Spines und Boutons rekrutieren bzw. überflüssige schrumpfen und sogar ganz verschwinden [Fu et al., 2012, Hofer et al., 2009, Holtmaat et al., 2009b, Holtmaat et al., 2005, Sala et al., 2014]. Steffens et al. argumentieren, dass stabile und transiente Spines morphologisch unterschiedlich sind; so sind stabile generell größer und besitzen einen längeren Hals als transiente [Steffens et al., 2021]. Auch fanden sie heraus, dass kurzfristig, ca. innerhalb von 3 Tagen, eine hohe Variabilität der strukturellen Plastizität besteht, welche sich jedoch auf lange Sicht stabilisiert [Steffens et al., 2021]. Im Kontext von neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer Demenz, Huntington und Parkinson Erkrankung [Chidambarama et al., 2019, Herms et al., 2016, Kweon et al., 2017, Liebscher et al., 2012, Liebscher et al., 2014, Villalba et al., 2010] wurden mehrfach Veränderungen von synaptischen Strukturen beschrieben, welche früh in der Erkrankung, vor dem Einsetzen der Neurodegeneration, bereits beobachtet werden konnten.

Auch bei der ALS wurden Veränderungen von synaptischen Strukturen vor allem anhand transgener Mausmodelle beobachtet. Die Spines sind v.a. auf PZ in den Motorkortizes während der Pathogenese der ALS untersucht worden: Fogarty et al. zeigten nicht nur eine Reduktion der Kortexdicke, sondern auch, dass CSMN im *SOD1* Mausmodell schon früh eine fortschreitende Dendritendegeneration und einen Verlust der Spines aufweisen [Fogarty et al., 2016b]. Auf PZ in L2/3 ist zwar eine frühe Reduktion der apikalen Spines beobachtbar, aber erst im späteren Verlauf eine apikale Verkürzung der Dendriten [Fogarty et al., 2016b]. Die Untersuchungen an der transgenen *TDP-43^{Q331K}* Mauslinie zeigen hingegen eine erhöhte Dichte der dendritischen Spines an L5 PZ [Fogarty et al., 2016a]. Im *SOD1* Mausmodell weisen SMN des zwölften Hirnnervs im Gegensatz zu CSMN eine Spinedichteerhöhung auf; an neonatalen lumbalen SMN konnte nach initialer Erhöhung der Spinedichte eine

progressive Normalisierung und ab einem Alter der Versuchstiere von 120 Tagen eine Reduktion der Dichte beobachtet werden [Fogarty et al., 2017]. Diese präsymptomatischen Veränderungen könnten auf ein Krankheitsstadium geprägt von noch kompensierten Veränderungen im motoneuronalen Netzwerk hinweisen. Zusätzlich weisen diese Erkenntnisse darauf hin, dass ALS auch als eine Synaptopathie betrachtet werden kann.

Untersuchungen der humanen Dendriten und deren Spines von ALS Patienten werden überwiegend an post-mortem Gewebe durchgeführt. Genç et al. [Genç et al., 2017] konnten in post-mortem Gewebeschnitten des Motorkortex nachweisen, dass Betz Zellen von ALS Patienten ein kleineres Somavolumen aufweisen als die der Kontrollgruppe. Außerdem konnten viele Vakuolisierungen in den apikalen Dendriten nachgewiesen werden [Genç et al., 2017]. Zusätzlich untersuchte das Team auch die Dichte der prä- und postsynaptischen Strukturen nahe der apikalen Dendriten mit Hilfe von immunozytochemischen Markern: Die Dichte der Präsynapsen war bei den Gewebepreparaten der Patienten und Kontrollgruppe gleich, jedoch sowohl Postsynapsen als auch ko-lokalisierte prä- und postsynaptische Marker, welche aktive Synapsen darstellen, waren bei ALS Patienten signifikant erniedrigt [Genç et al., 2017].

Die strukturellen Änderungen an den Synapsen eröffnet die Frage, ob auch die funktionellen Eigenschaften des motorischen Schaltkreises sich während der Pathogenese der ALS signifikant verändern.

4.1.3.7 Kortikale Übererregbarkeit bei der ALS – Schaltkreismechanismen der MN Degeneration

Ein konsistentes Ergebnis aus Mausversuchen und klinischen Studien an ALS Patienten sind Veränderungen in der Erregbarkeit der MN bzw. des gesamten motorischen Kortex schon während der präsymptomatischen Phase in der Pathogenese der ALS. Dies ist wahrscheinlich bedingt durch sowohl zellautonome Veränderungen, als auch Wechselwirkungen mit Gliazellen und IN [Gunes et al., 2020]. Es konnten mit Hilfe von transkranieller magnetischer Stimulation (TMS) und Elektromyografie an Patienten Hinweise für eine Übererregbarkeit des motorischen Kortex gesammelt werden [Cengiz et al., 2019, Cengiz et al., 2020, Kim et al., 2005, Shibuya et al., 2017, Van Den Bos et al., 2018, Vucic et al., 2010]. Auch Elektrokortikographieuntersuchungen von *SOD1* und *FUS* transgenen Mäusen erbrachten Hinweise auf eine kortikale Übererregbarkeit, genauso wie sALS Patienten in der Elektroenzephalographie [Scekic-Zahirovic et al., 2024]. Kim et al. konnten anhand einer *SOD1* mutierten Mauslinie zeigen, dass die Übererregbarkeit des motorischen Kortex im Rahmen der ALS auch auf eine Übererregbarkeit der CSMN zurückzuführen ist [Kim et al., 2017]. Unter den SMN scheint jedoch nur eine kleine Subgruppe Übererregbarkeit aufzuzeigen und somit unabhängig von veränderter Elektrophysiologie zu degenerieren [Delestrée et al., 2014, Leroy et al., 2014]. Die Erregbarkeit von MN ist eine elektrophysiologische Eigenschaft der Neuronen: Die Neigung der Zelle, auf einen bestimmten Input mit einer Depolarisierung ihres Membranpotentials zu reagieren. Sie ist abhängig von einer Vielzahl von Parametern, wie zum Beispiel der Expression von Rezeptoren, Ionenkanälen und Transportern. Aus der intrinsischen Erregbarkeit und dem synaptischen Input resultiert die Aktivität

des Neurons, d.h. die Frequenz von AP. Übererregbarkeit ist als gesteigerte Antwort auf einen Stimulus oder eine niedrigere Reizschwelle definiert.

Kortikale Exzitabilität bezieht sich nicht nur auf die Elektrophysiologie der CSMN, sondern auf alle kortikalen Zellen. Zur experimentellen Untersuchung der kortikalen Erregbarkeit stehen verschiedene Methoden zur Verfügung: Mit Hilfe von optischen Indikatoren, die auf elektrische Spannung bzw. Ca^{2+} reagieren, ist es möglich, *in vitro* Tiergewebe bzw. sogar *in vivo* Tiermodelle zu untersuchen. Mit invasiven Methoden können direkte Messungen der Potentiale von Zellverbänden und auch von einzelnen Neuronen untersucht werden. Um *in vivo* Daten von Patienten zu erhalten, werden nichtinvasive Methoden wie schon o.g. TMS oder Elektroenzephalographie verwendet. [Gunes et al., 2020]

Die Elektrophysiologie von Neuronen basiert auf Ionen, ihren Strömen und den Gradienten, die sie zwischen Intra- und Extrazellulärraum aufbauen. Auch hier gibt es Hinweise für Veränderungen im Rahmen der ALS: In einer Zellkultur von CSMN gewonnen aus transgenen *SOD1* Mäusen konnte ein erhöhter persistenter Natriumionen- (Na^+) Strom nachgewiesen werden [Pieri et al., 2009]. Der Schwellenwert der persistenten Na^+ Kanäle war unverändert, jedoch konnte eine erhöhte Amplitude des Na^+ Stroms gemessen werden [Pieri et al., 2009]. Dies könnte einen Faktor für die kortikale Übererregbarkeit darstellen. Eine weitere Veränderung ist ein verringerter Kaliumionen- (K^+) Strom. Dieser konnte bisher jedoch nur indirekt via verringerte Anzahl an K^+ Kanälen und für deren Synthese benötigte mRNA in SMN von ALS Patienten nachgewiesen werden [Jiang et al., 2005, Kanai et al., 2006, Shibuya et al., 2011]. Weitere Funktionsträger im Kaliumhaushalt sind Astrozyten. In einem *Sod1*^{G93A} Rattenmodell wurde eine verringerte Expression von K^+ Kanälen in Astrozyten festgestellt [Bataveljić et al., 2012]. Dies könnte zu erhöhten extrazellulären K^+ Konzentrationen führen und eine Depolarisation der CSMN erleichtern. Lederer et al. haben das Genom bzw. dessen Expression von sALS Patienten untersucht [Lederer et al., 2007]. Sie konnten zeigen, dass die Expression von Untereinheiten der Na^+/K^+ Adenosintriphosphatase (ATPase) und des K^+ /Chlorid (Cl^-) Kotransporters herunterreguliert ist [Lederer et al., 2007]. Marcuzzo et al. fanden zudem eine abnorme extrazelluläre Ionenkonzentration von Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Cl^- [Marcuzzo et al., 2019]. Der veränderte Ionenhaushalt führt sehr wahrscheinlich zu einer verkürzten Refraktärzeit und einer herabgesetzten Erregungsschwelle [Brunet et al., 2020, Do-Ha et al., 2018].

CSMN nutzen den Neurotransmitter Glutamat zur synaptischen Erregungsweiterleitung. Eine weitere Hypothese in Verbindung mit Neurodegeneration in der ALS ist Glutamat assoziierte Erregungstoxizität. Im Liquor von Patienten konnten erhöhte Konzentrationen von Glutamat nachgewiesen werden [Rothstein et al., 1990]. Eine Überstimulation könnte in Verbindung mit der kleinen Ca^{2+} Pufferkapazität der MN zu Zellschäden und final zum Zelltod führen [Van Den Bosch et al., 2006]. Astrozyten regulieren maßgeblich die synaptischen Glutamatkonzentrationen (siehe Abb. 3). Sie nehmen Glutamat aus dem synaptischen Spalt auf und schützen Neuronen so vor Überstimulation. In humanen post-mortem Gewebeschnitten konnte eine verringerte Expression von drei Glutamat Transportern,

Glutamat Transporter GLT-1 und engl. excitatory amino acid transporters EAAT1 bzw. 2, in Astrozyten nachgewiesen werden [Lin et al., 1998, Pardo et al., 2006, Rothstein et al., 1995]. Dies könnte zur Folge haben, dass Astrozyten ihre Funktion nicht bzw. nicht erfolgreich ausführen können und so die MN anfällig für Exzitotoxizität werden.

In der Krankheitsentstehung der humanen ALS kommt es zu veränderter Genexpression im M1 [Andrés-Benito et al., 2017, Aronica et al., 2015, Lederer et al., 2007, Wang et al., 2006]: Es wurden veränderte Kanäle, Transporter und wie schon erwähnt Rezeptoren gefunden: Na⁺/K⁺ ATPase, spannungsabhängige Na⁺ und K⁺ Kanäle, K⁺/Cl⁻ Kotransporter, Glutamattransporter und -rezeptoren sowie GABA Rezeptoren [Brunet et al., 2020, Do-Ha et al., 2018]. Riluzol, das einzige in Deutschland zur Behandlung der ALS zugelassene Medikament, hemmt präsynaptisch die Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt; zusätzlich inaktiviert die Substanz postsynaptisch ionotrope Glutamatrezeptoren und spannungsabhängige Na⁺ Kanäle [Jaiswal, 2019]. Da der Effekt der Therapie sich aber nur auf eine dreimonatige Verlängerung der medianen Überlebenszeit beläuft, ist es wahrscheinlich, dass weitere Faktoren die Degeneration der MN hervorrufen [Miller et al., 2012].

Die genauen Ursachen der kortikalen Übererregbarkeit sind unzureichend verstanden. Neben Veränderungen von exzitatorischen Nervenzellen gibt es auch Hinweise auf eine gestörte Funktion von IN [Gunes et al., 2020]. Mit der schon angesprochenen TMS bzw. der kurzzeitigen intrakortikalen Hemmung (engl. short-interval intracortical inhibition, SICI), einem bestimmten Stimulationsregime, ist es möglich die inhibitorisch wirksame Neuronenpopulation im Kortex zu untersuchen [Kim et al., 2005]. In Verbindung mit der ALS Erkrankung wurde eine verringerte intrakortikale Inhibition gemessen [Cengiz et al., 2019, Cengiz et al., 2020, Shibuya et al., 2017, Van Den Bos et al., 2018]. Im *SOD1* Zebrafischmodell und in Wobbler Mausmodell konnten reduzierte inhibitorische Signale gemessen werden [McGown et al., 2013, Moser et al., 2013].

4.1.3.8 Kortikale Interneuronen

Kortikale neuronale Netzwerke bestehen zu ca. 20% aus IN, welche durch die Freisetzung des Transmitters GABA die nachgeschalteten Neuronen inhibieren und somit Aktivität und Informationsprozessierung im Netzwerk regulieren. [Swanson et al., 2019, Tremblay et al., 2016]. Diese inhibitorisch wirksame Gruppe scheint eine große Rolle in der gestörten exzitatorischen/ inhibitorischen Balance des Kortex und somit in der Hypothese der Übererregbarkeit der MN in der ALS zu spielen [Brunet et al., 2020, Clark et al., 2018, Do-Ha et al., 2018, Khademullah et al., 2020, McGown et al., 2013, Zhang et al., 2016]. Trotz dessen ist noch nicht viel bekannt über die GABAergen IN. Im Folgenden wird der Fokus auf die inhibitorischen IN im M1 gelegt werden, da diese Gruppe im Zentrum der durchgeführten Versuche stehen.

Obwohl die heterogene Gruppe der GABAergen, inhibitorischen IN nur einen kleinen Teil der zellulären Bestandteile des Kortex ausmachen, wird ihnen eine wichtige Rolle im neuronalen Netzwerk eingeräumt [Gunes et al., 2020, Swanson et al., 2019]. Ihre Axone sind sehr stark verzweigt, wodurch IN vielschichtige Verbindungen knüpfen und so Einfluss auf zeitliche Präzision, Plastizität, Synchronisation und das Gleichgewicht

PV IN werden aufgrund Ihrer Morphologie in Korbzellen und Chandelier-Zellen unterteilt. Chandelier-Zellen haben ihren Namen durch die charakteristische Anordnung der Synapsen, die sie an den axonalen Initialsegmenten der PZ bilden, verliehen bekommen. Man kann ihre Somata v.a. in L2 und L6 erkennen. Korbzellen bilden vorwiegend perisomatische Synapsen aus. Sie sind die häufigste Unterart aller IN und deswegen am besten untersucht. Ihr elektrisches Potentialverhalten wird als engl. fast spiking klassifiziert, da die Inhibition sehr schnell, stark und zeitlich sehr genau ausgelöst wird. Als Funktion wird Ihnen zugeschrieben, dass sie fehlerhafte Signale der CSMN unterbinden. Ihre Somata sind ubiquitär in allen histologischen Schichten, mit Ausnahme der zellarmen Schicht L1, aufzufinden. [Tremblay et al., 2016]

SOM IN hingegen bilden dendritische Kontakte aus und werden in Martonetti-Zellen und nicht-Martonetti-Zellen unterteilt. Martonetti-Zellen sind v.a. in den Schichten L2 und L3 im Mausmodell vertreten, bilden aber eine sehr dichte axonale Innervation der kortikalen Schicht L1 aus. Hier beeinflussen sie PZ über deren apikale Dendriten. Nicht-Martonettis projizieren entweder auch auf PZ oder auf PV IN und wirken so disinhibierend, d.h. exzitatorisch. [Tremblay et al., 2016]

Die dritte Kategorie der GABAergen IN wird durch den Serotoninrezeptor 5HT3aR und dem vasoaktiv intestinalen Peptid (VIP) klassifiziert. VIP IN mit bipolarer Dendritenmorphologie sind v.a. in L2/3 aufzufinden, in L6 hauptsächlich in multipolarer Struktur. Diese beiden unterscheiden sich auch in Bezug auf die Verläufe ihrer Axone im Kortex, die jedoch beide v.a. auf SOM IN projizieren. Zudem sind diese IN durch einen hohen Input Widerstand gekennzeichnet. Sie feuern initial stark, sog. initial burst, und verfallen dann in ein unrythmisches und schwächeres Aktionspotenzialmuster. Die neurogliaformen Zellen (NGFZ) der Non-Vip 5HT3aR IN bilden mit 90% aller IN in L1 den größten Anteil aller IN im Stratum moleculare. NGFZ verdanken ihren Beinamen Spinnwebenzellen ihrer Morphologie: Ein kleines, rundes Soma umringt von radial angeordneten Dendriten. Sie bilden dendritische Synapsen mit anderen IN und PZ. Auch Cholecystinin exprimierende Korbzellen (CCKZ) wurden als Non-VIP IN beschrieben. Sie vermitteln perisomatisch eine langanhaltende Inhibition von PZ. [Tremblay et al., 2016]

Abhängig von der Art und Weise, wie die IN im Schaltkreis eingebunden sind, können sie verschiedene Rollen einnehmen. So ist proximale Inhibition effektiver als distale [Koch et al., 1983, Vu et al., 1992]. Inhibition kann sowohl Feedforward, als auch Feedback, erfolgen (siehe Abb. 5). In der Feedforward Verschaltung wird ein AP anterograd in der Zielzelle, im motorischen System in einer PZ, ausgelöst. PV Korbzellen sind z.B. in so einer Schaltung aufzufinden. Ihre elektrophysiologischen Eigenschaften verleihen ihnen eine hohe zeitliche Genauigkeit und Geschwindigkeit. Tremblay et al. sprechen den Korbzellen eine Rolle als Koinzidenzdetektor zu, d.h., dass die IN alle zufälligen und fehlerhaften Signale von PZ inhibieren. Feedback Inhibition ist durch eine rekurrente Hemmung gekennzeichnet. Neben der retrograden Projektion auf dieselbe Zelle, von der das IN angesteuert wird, können noch andere PZ von dem IN Signale erhalten. Projiziert das IN auch auf andere PZ, inhibiert es somit diese PZ und unterbindet dort eine Entstehung eines AP. PV und SOM IN

synchronisieren PZ und unterdrücken lokales Hintergrundrauschen. [Tremblay et al., 2016]

Der Begriff Disinhibition bezeichnet die Hemmung einer inhibierenden Zelle. Dies führt zu einer Reduktion der Hemmung, also einer relativen Aktivierung der dritten Zelle (siehe Abb. 5). Wie oben erwähnt, projizieren VIP IN bevorzugt auf SOM IN, welche wiederum PZ inhibieren. Je nach ausgebildeten Synapsen kann die VIP Zelle gleichzeitig mehrere PZ disinhibieren oder die räumliche Diskrepanz in einem Zellverband jener Zellen erhöhen.

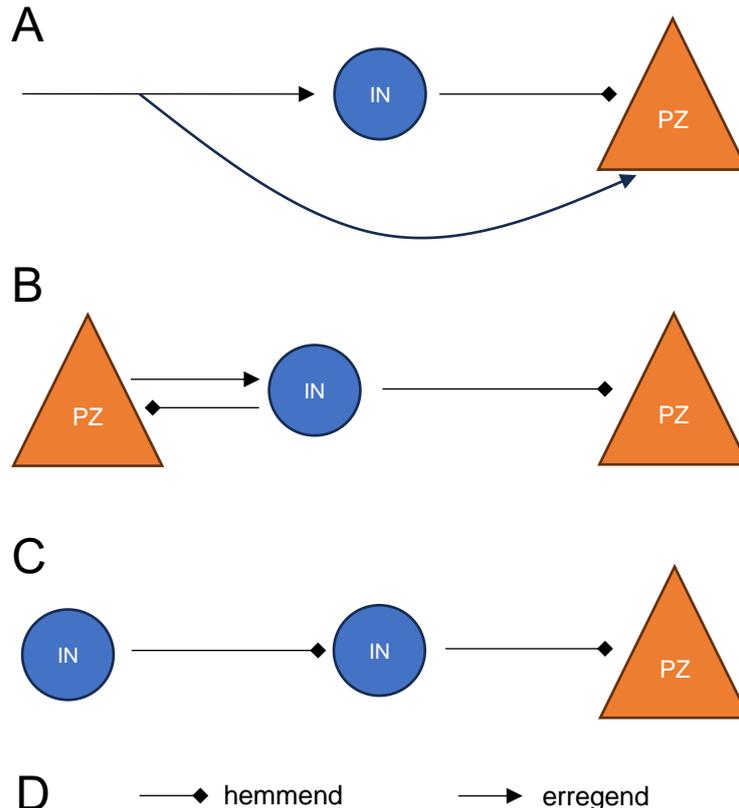


Abb. 5: Netzwerkverschaltungen der IN

A: Feedforward Schaltung, B: Feedback Schaltung, C: Disinhibition, D: Legende der hemmenden (GABAergen) bzw. erregenden (glutamatergen) interzellulären Signale; IN: Interneuron, PZ: Pyramidenzelle. [Tremblay et al., 2016]

4.1.3.9 Veränderungen von kortikalen Interneuronen bei der ALS

Ein Defizit der GABAergen Innervation könnte pathomechanisch auch eine kortikale Übererregbarkeit zur Folge haben. Schon 2011 präsentierten Nieto-Gonzalez et al. Daten, welche auf eine verringerte GABAerge Inhibition auf die CSMN im Wobbler Mausmodell der ALS hinweisen [Nieto-Gonzalez et al., 2011]. Die Rolle von Interneuronen in der ALS ist bisher unzureichend bekannt. Erste Untersuchungen legen allerdings nahe, dass auch IN während der ALS funktionell und evtl. auch strukturell verändert sind. Die genaue Rolle insbesondere der verschiedenen Subtypen in der Pathogenese der ALS ist bisher nicht genau verstanden. In einem transgenen Mausmodell basierend auf der Expression von mutiertem TDP-43^{A315T} konnten hyperaktive SOM IN in Zusammenhang mit der Übererregbarkeit von CSMN nachgewiesen werden [Zhang et al., 2016]. Eine fokale Ablation dieser SOM IN führte

zu physiologischer Erregbarkeit der CSMN und gelinderter Neurodegeneration [Zhang et al., 2016]. In einer aktuellen Publikation konnte sogar gezeigt werden, dass IN auch mittels chemogenetischer Methoden als therapeutisches Ziel dienen können. So wurde die Erregbarkeit von hypoaktiven PV IN in einem *SOD1* Mausmodell mittels sog. Designer-rezeptoren ausschließlich aktiviert durch Designermedikamente (engl. Designer receptors exclusively activated by designer drugs, DREADD) wieder erhöht, was außerdem zur Normalisierung der Hyperaktivität von CSMN führte und zudem auch den Krankheitsprozess in den Versuchstieren verlangsamte [Khademullah et al., 2020]. Khademullah et al. nutzten dafür den veränderten humanen muskarinergen Rezeptor hM3D, welcher eine hohe Sensitivität für Clozapin N-oxid besitzt, aber dafür kaum auf Acetylcholine reagiert [Khademullah et al., 2020, Roth, 2016].

4.1.3.10 Interneuronen im motorischen Vorderhorn des Rückenmarks und ALS assoziierte Veränderungen

Auch auf spinaler Ebene gibt es Untersuchungsergebnisse mit Hinweisen auf Einflüsse der IN auf die SMN. Im Vorderhorn des Rückenmarks sind andere IN vertreten als im Kortex: Es wurden inhibitorische Klasse I, exzitatorische Klasse II IN, präsynaptische IN und Renshaw Zellen beschrieben [Côté et al., 2018]. Letztere bewirken eine rekurrente Hemmung auf die SMN und sollen SMN synchronisieren und ihre Signale stabilisieren. Die Aufgabe der präsynaptische IN ist die Integration von sensorischen Signalen aus der Peripherie in Reflexbögen und bewusste Motorik. Klasse I IN spielen eine Rolle in der reziproken Inhibition der Agonisten bzw. Antagonisten, Koordination zwischen linker und rechter Körperhälfte und Integration der Daten zur Muskelfaserspannung der Golgi Sehnenapparate. Klasse II IN bekommen Signale von den Muskelspindeln und sind Teil von Reflexbögen und der Koordination von Kontraktionen der Muskelfasern im Dehnungszustand. Der meistgenutzte inhibitorische Neurotransmitter ist Glycin. [Côté et al., 2018]

Raynor et al. konnten schon 1994 zeigen, dass ALS Patienten eine verringerte rekurrente Inhibition aufweisen [Raynor et al., 1994]. Dies könnte ein Hinweis auf verringerte Aktivität der Renshaw Zellen sein. Unterstützt wird die Hypothese durch eine verringerte Dichte an Glycin Rezeptoren, welche in Korrelation mit dem Grad der SMN Degeneration stand [Whitehouse et al., 1983]. Das *SOD1^{G93A}* Mausmodell zeigt präsymptomatisch einen progressiven Verlust von postsynaptischen Glycinrezeptoren der SMN und Degeneration von Renshaw Zellen mit dem Einsetzen der motorischen Symptome [Chang et al., 2009]. Sunico et al. untersuchten die hypoglossalen MN in der gleichen *SOD1^{G93A}* Mauslinie und konnten den Verlust von inhibitorischen Synapsen, eine erhöhte Anzahl an exzitatorischen Synapsen und somit eine gestörte exzitatorische/ inhibitorische Balance in der präsymptomatischen Phase nachweisen [Sunico et al., 2011]. Diese Ergebnisse zeigen, dass IN sowohl auf kortikaler als auch spinaler Ebene im ZNS eine Rolle im Fortschreiten der ALS spielen könnten und weiterhin, trotz komplizierter Erreich- und Untersuchbarkeit, Gegenstand zukünftiger Forschung sein sollten.

4.1.4 Stellenwert der Versuche

ALS ist eine fatale Krankheit mit fundamentalen Auswirkungen auf die Lebensqualität der Patienten ohne kausale Therapie. Wie oben schon erörtert, ist die Pathogenese

bis heute, trotz jahrzehntelanger Forschung, nicht vollständig entschlüsselt. In klinischen Untersuchungen konnte eine veränderte kortikale Erregbarkeit sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen nachgewiesen werden (siehe 4.1.3.7). Neben zellautonomen Änderungen der MN Erregbarkeit empfangen die CSMN auch Signale von anderen, zum Teil weit entfernten, Zelltypen. Es wird eine gestörte inhibitorische/exzitatorische Balance vermutet. Eine der wichtigsten Quellen der Inhibition im Kortex sind die oben vorgestellten IN (siehe 4.1.3.8). Diese sehr heterogene Gruppe ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch ist ihr Einfluss auch in anderen kortikalen Erkrankungen nachgewiesen (siehe 4.1.3.8 und 4.1.3.9). In den hier vorgestellten Experimenten soll eine Untergruppe, die SOM IN, im Rahmen der Pathogenese der ALS *in vivo* strukturell näher untersucht werden.

Um die Struktur genetisch definierter Zelltypen *in vivo* zu untersuchen, eignet sich insbesondere das Verfahren der Zweiphotonenmikroskopie.

4.2 Zweiphotonenmikroskopie

Diese Fluoreszenzmikroskopietechnik wird seit 1990 [Denk et al., 1990] erfolgreich angewandt. Dem Einsatz von bildgebenden Verfahren in *in vivo* Experimenten eröffnete diese Erfindung viele neue Möglichkeiten, weil sie z.B. den phototoxischen Effekt verglichen mit den älteren Fluoreszenzmikroskopieverfahren reduziert [Sanderson et al., 2014, So et al., 2000]. Da diese Methode der dreidimensionalen Bildgebung einen zentralen Stellenwert in den Experimenten spielt, soll im Folgenden die Funktionsweise und der Aufbau näher beleuchtet werden.

4.2.1 Fluoreszenz

Dem Prinzip der Fluoreszenz liegt die Anregung von fluoreszierenden Indikatoren, wie z.B. dem verbesserten grün fluoreszierenden Protein (eGFP, $\lambda=510\text{nm}$), und folgende Emission von sichtbarem Licht zugrunde. Essenziell sind eine Lichtquelle und ein kompatibles fluoreszierendes Protein, der Fluorophor. Ausgesandte Photonen der Lichtquelle treffen auf den Fluorophor. Diese Substanz absorbiert die Lichtenergie, woraufhin das Energieniveau des Moleküls angehoben wird. Dieser instabile Zustand zerfällt wenige Nanosekunden später und das Molekül fällt auf sein altes Energieniveau zurück. Die Energiedifferenz wird in Form eines Photons freigesetzt. Der Wirkungsgrad der Transformation entspricht nicht 100%, also geht ein Teil der Lichtenergie verloren. D.h., dass das absorbierte Photon mehr Energie besitzt als das emittierte (siehe Abb. 6). Diese daraus resultierende Verschiebung der Wellenlänge wird auch Stokes Shift genannt. Die Energie des Lichts korreliert direkt mit Ihrer Wellenlänge: Blaues Licht mit kurzer Wellenlänge besitzt mehr Energie als rotes mit langer Wellenlänge. [Sanderson et al., 2014, So et al., 2000]

Der Zweiphotoneneffekt beruht darauf, dass zwei Photonen mit gleicher Wellenlänge, die gleichzeitig auf den Fluorophor treffen, auch gemeinsam absorbiert werden. Das emittierte, singuläre Photon hat mehr Energie als jedes der absorbierten Photonen für sich (siehe Abb. 6). Die Wellenlänge der emittierten Fluoreszenz ist von den physikalischen Eigenschaften des verwendeten Fluorophors und der Wellenlänge der Lichtquelle abhängig. Um das gleichzeitige Auftreffen von zwei (oder mehr) Photonen gewährleisten zu können, muss die Lichtquelle eine hohe Photonendichte erzeugen

können. Dies wird erreicht durch einen Laser, der kurze, hochfrequente, aber starke Pulse generiert (ca. 100 fsec, 80 MHz, Spitzenleistung von mehreren hundert kW). [Sanderson et al., 2014, So et al., 2000]

Lichtstrahlen mit einer längeren Wellenlänge können tiefer in Gewebe eindringen als Lichtstrahlen kürzerer Wellenlänge. Durch das Verwenden zweier Photonen zum Anregen des Fluorophors können Anregungswellenlängen von ca. 690-1040 nm [Holtmaat et al., 2009a] genutzt und somit eine höhere Eindringtiefe erzielt werden. [Sanderson et al., 2014, So et al., 2000]

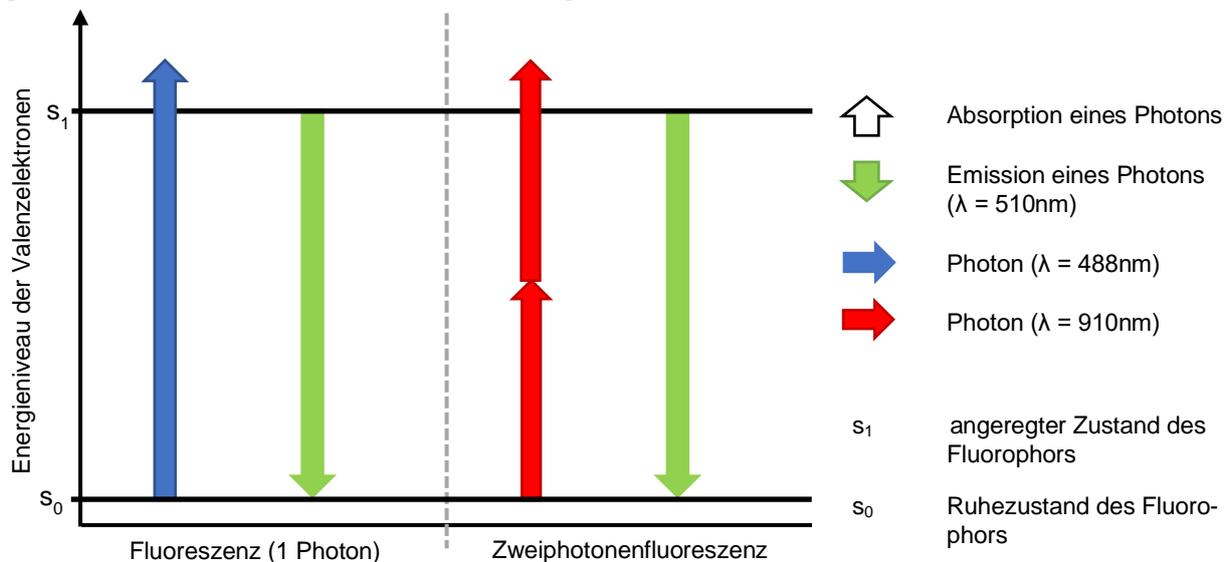


Abb. 6: Jablonski Diagramm

Vereinfachte Darstellung des Einflusses der jeweiligen Photonenaufnahmen bzw. -emissionen auf den Zustand der Valenzelektronen des Indikatorpartikels im Prozess der Fluoreszenz sowohl unter Verwendung von einem als auch von zwei Photonen gleichzeitig. [Sanderson et al., 2014]

4.2.2 Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops

Die Herausforderung eines solchen bildgebenden Verfahrens besteht darin, emittiertes Licht vom initial erzeugten Lichtstrahl zu trennen und auch nur die emittierte Fluoreszenz vom Detektor registrieren zu lassen. Ein Fluoreszenzmikroskop besteht aus mehreren Komponenten: Einer Lichtquelle zur Erzeugung des anregenden Lichts (engl. excitation light), einem dichroitischen Spiegel zur Modulation des anregenden Lichts, einem Objektiv, einem zweiten dichroitischen Spiegel zur Modulation des emittierten Lichts und einer unbestimmten Anzahl an Linsen, Spiegeln, Detektoren und Filtern [Sanderson et al., 2014] (siehe Abb. 7):

Je nach Lichtquelle kann ein Farbfilter eingesetzt werden, um sicherzustellen, dass nur das gewünschte Licht zur Probe gelangt. Jedoch birgt der Einsatz von Filtern immer das Risiko von Intensitätsverlusten sowohl des Laser- als auch des emittierten Lichtstrahls.

Als nächstes trifft der Laserstrahl auf einen dichroitischen Spiegel und wird durch das Objektiv auf die zu untersuchende Probe gerichtet. Der dichroitische Spiegel lässt Licht mit bestimmten Wellenlängen passieren, aber reflektiert alle anderen. Es handelt sich um einen selektiven, semipermeablen Spiegel. Ein gemischter Lichtstrahl mit verschiedenen Wellenlängen kann so getrennt werden, unter der Voraussetzung, dass die Wahl der Wellenlänge des Lasers, des verwendeten Fluorophors und der

Eigenschaften des dichroitischen Spiegels aufeinander abgestimmt sind. Je nach Setup kann als zusätzliches Element noch ein Bandpassfilter verwendet werden, dessen Aufgabe es ist, jegliches anregendes Licht von den Detektoren abzuschirmen. Dieser birgt, wie oben beschrieben, jedoch den Nachteil des Intensitätsverlustes.

Eine Möglichkeit mehrere Indikatoren mit verschiedenen Wellenlängen zu benutzen und somit verschiedene Zellpopulationen zu untersuchen ist der Einsatz von einem oder mehreren weiteren dichroitischen Spiegel/n. So werden die verschiedenen zu detektierenden Wellenlängen getrennt und können unabhängig voneinander gemessen werden. Vor der Detektion werden optional noch Bandpassfilter zur weiteren Selektion des Lichtspektrums eingesetzt. Die separierten Wellenlängen werden über ‚photomultiplier tubes‘ (PMT) detektiert.

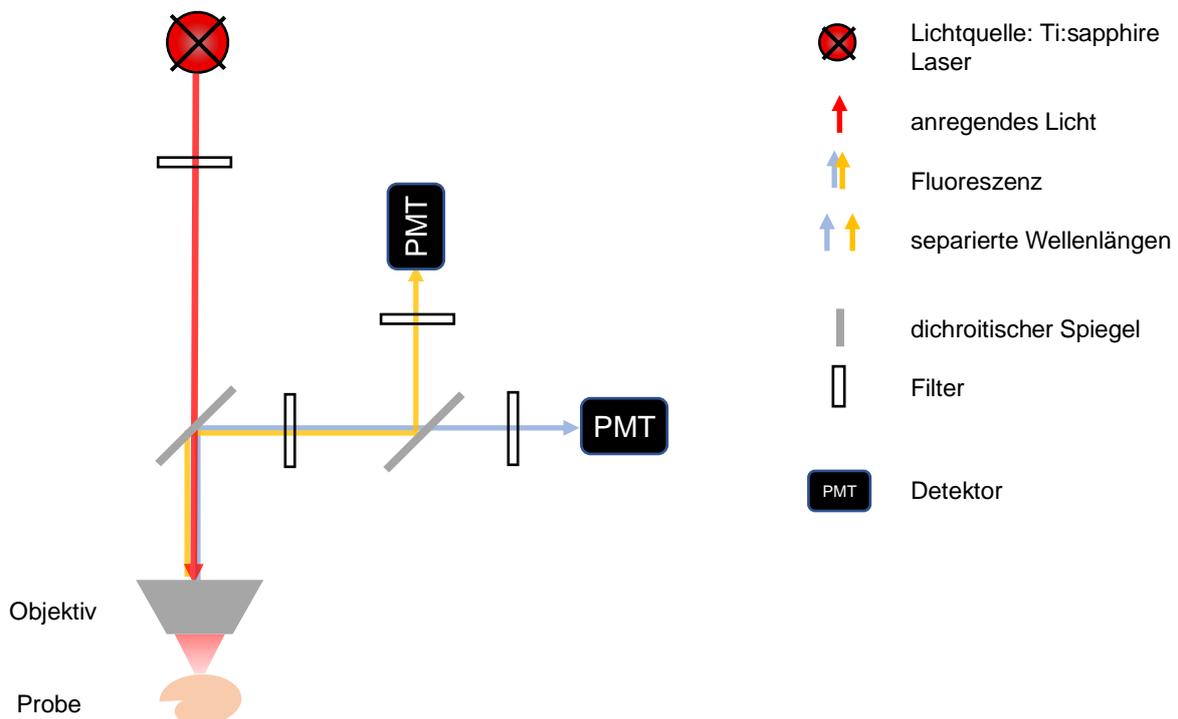


Abb. 7: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops

Die Lichtquelle erzeugt einen gepulsten Photonenstrahl, welcher durch das Objektiv auf die zu untersuchende Probe ausgerichtet wird. Dort werden die Fluorophoren angeregt – es entsteht Fluoreszenzstrahlung. Diese passiert das Objektiv und wird am dichroitischen Spiegel reflektiert. Die am zweiten dichroitischen Spiegel separierten Photonenströme werden in Detektoren registriert. Alle Filter sind optional und dienen dem Zweck einer geringeren Spektrenbreite der jeweiligen Lichtstrahlen auf Kosten der Intensität derselben. [Brunet et al., 2020, Sanderson et al., 2014]

4.2.3 Besonderheiten eines Zweiphotonenmikroskops

Die meisten Charakteristiken der Lichtquelle wurden zuvor schon näher erörtert: Ein Laser, der durch kurze und hochfrequente Lichtpulse in der Lage ist in der Bildebene eine sehr hohe räumliche und zeitliche Photonendichte zu generieren, damit die Fluoreszenz im Fluorophor ausgelöst werden kann. Laser ist ein englisches Akronym für Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung (engl. light amplification by stimulated emission of radiation). Verglichen mit herkömmlichen Lichtquellen, wie z.B. einer Glühbirne, kennzeichnet sich ein Laserstrahl mit einem sehr engen Frequenzbereich. D.h., der Laser erzeugt einen gebündelten, monochromatischen Lichtstrahl mit einer großen Kohärenzlänge. Die Kohärenzlänge ist als maximale

Wegstrecke definiert, die zwei Lichtstrahlen aus derselben Lichtquelle zurücklegen und bei Überlagerungen ein stabiles Interferenzmuster erzeugen können.

In der Zweiphotonenmikroskopie (2P Mikroskopie) ist das Areal, in dem fluoreszierende Teilchen in der Probe angeregt werden, sehr klein. Dies ist bedingt dadurch, dass die benötigte Photonendichte nur im Fokuspunkt des Objektivs besteht. Sowohl oberflächlichere als auch tiefere Moleküle können von den einzeln auftreffenden Lichtteilchen nicht auf ein höheres Energieniveau gehoben werden, weil, wie oben beschrieben, zwei Photonen gleichzeitig auf einen Fluorophor auftreffen müssen, um die Fluoreszenz auszulösen. Wie oben beschrieben ist der Einsatz von langwelligerem Licht möglich, welches weniger Energie transportiert als bei herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie. Zusammen mit den Relaxationsphasen zwischen den pulsierenden Laserstrahlen kann so die thermische Entwicklung, der phototoxische Effekt und das Bleaching des Fluorophors minimiert werden. Diese Vorteile ermöglichen erst das chronische Aufnehmen von *in vivo* Bildern in Mäusen. Außerdem entsteht verglichen mit z.B. einem Konfokalmikroskop weniger fluoreszierendes Licht außerhalb der fokalen Bildebene und es wird kein Pinhole benötigt. Ein Pinhole ist ein donutförmiger Filter, der in einem Konfokalmikroskop direkt vor den Detektor geschaltet werden muss, um Licht, welches nicht aus der fokussierten Ebene stammt, herauszufiltern und die Bilder nicht zu verfälschen. [Sanderson et al., 2014]

Neben den hier angeführten Vorteilen müssen auch Nachteile in Kauf genommen werden: Im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie ist nur eine halb so dichte Auflösung erreichbar. Auch gibt es generelle Nachteile der fluoreszenzbasierten Mikroskopie: Ein Problem wäre Autofluoreszenz. Dieser Begriff bezeichnet Partikel, die auch ohne den Einsatz von Fluorophoren selbst fluoreszieren. Eigenfluoreszenz ist vor allem beim Untersuchen von intaktem Gewebe oder *in vivo* ein Problem: Z.B. Kollagene oder Elastin in der Extrazellulärmatrix sind häufig autofluoreszent. Je nach Versuch kann es von Vorteil sein, zuerst Proben ohne Einsatz von Fluorophoren zu mikroskopieren und dann passende Filter und/ oder Indikatoren auszuwählen.

4.2.4 Transgene Mauslinie zur Markierung von Interneuronen

Zur Visualisierung von Interneuronen nutzte ich die GIN (engl. GFP expressing Inhibitory Neurons) Mauslinie von Oliva et al. [JacksonLaboratory, Oliva et al., 2000]. Diese Mäuse exprimieren GFP in GABAergen IN und eignen sich somit für Untersuchungen der synaptischen Strukturen von IN mittels 2P Mikroskopie. Die transgen markierten IN zeigen eine starke Fluoreszenz im Soma, aber auch in den Dendriten und Axonen. Oliva et al. zeigten, dass die GIN v.a. in den neokortikalen Schichten L2-4 aufzufinden sind. Die GIN sind zu 98% SOM IN, aber weisen eine starke morphologische Diversität auf. Riedemann et al. untersuchten die Zellpopulation im cingulären Kortex: 98% der GIN sind SOM IN, aber nur 50% der SOM IN weisen eine GFP Expression auf. Die GIN sind nicht nur durch unterschiedliche Morphologien gekennzeichnet, sondern auch durch verschiedene elektrophysiologische und neurochemische Eigenschaften. So konnte nachgewiesen werden, dass bei Mäusen eine Ko-Expression von Ca^{2+} bindenden Proteinen und Neuropeptid Y vorliegt. Diese Subtypen sind je nach Gehirnregion unterschiedlich

verteilt. Die Experimente zur Untersuchung der strukturellen Plastizität behandelt also nur einen begrenzten Anteil der SOM IN. [Oliva et al., 2000, Riedemann et al., 2015, Riedemann et al., 2018]

SOM IN sind im Gegensatz zu CSMN nicht so umfangreich charakterisiert worden [Caroni et al., 2012, Chidambaram et al., 2019, Fu et al., 2012, Hofer et al., 2009, Holtmaat et al., 2005, Kopec et al., 2006, Lendvai et al., 2000, Trachtenberg et al., 2002, Xu et al., 2009, Zuo et al., 2005b]. Sie beeinflussen die Aktivität der CSMN [Brunet et al., 2020, Tremblay et al., 2016] und könnten maßgeblich an der Pathologie beteiligt sein. Die kortikale Hyperaktivität scheint eine zentrale Rolle in der ALS zu spielen [Gunes et al., 2020], was auf ein Missverhältnis zwischen den physiologischen Aktivitäten der PZ und inhibitorischen IN hinweisen könnte [Cengiz et al., 2019, Cengiz et al., 2020, McGown et al., 2013, Moser et al., 2013, Shibuya et al., 2017, Van Den Bos et al., 2018]. Des Weiteren konnten in einem *TDP-43* Mausmodell nicht nur Hinweise auf hyperaktive SOM IN gesammelt werden, sondern führte eine Ablation der SOM IN zu einer physiologischen CSMN Aktivität [Zhang et al., 2016]. Auf der anderen Seite zeigten Nolan et al. dass sich in *in vitro* Gehirnschnitten eines *TDP-43* Mausmodells kaum intrazelluläre Proteinaggregate in IN nachweisen lassen [Nolan et al., 2020]. Um mehr Informationen zur synaptischen Aktivität der SOM IN zu gewinnen, nutzten wir die 2P Mikroskopie um die Prä- und Postsynapsen der IN in einem *SOD1* Mausmodell *in vivo* während der Pathogenese der ALS strukturell zu evaluieren.

5 Fragestellung und Zielsetzung

In meiner Dissertation untersuchte ich die folgenden Fragestellungen:

1. Ist die Zelldichte von Parvalbumin oder Somatostatin (SOM) exprimierenden Interneuronen (IN) im primär motorischen Kortex (M1) und im primär somatosensorischen Kortex (S1) in *SOD1^{G93A}* transgenen Tieren verändert?
2. Ist die Dichte und strukturelle Plastizität postsynaptischer Elemente (dendritischer Spines) von SOM IN im M1 krankheitsstadienabhängig in *SOD1^{G93A}* Mäusen verändert?
3. Ist die Dichte und strukturelle Plastizität präsynaptischer Elementen (axonalen Boutons) von SOM IN im M1 krankheitsstadienabhängig in *SOD1^{G93A}* Mäusen verändert?

6 Materialliste

Gerät	Modell	Hersteller
OP: Kraniales Fenster Implantation		
Operationsmikroskop	SMZ 171	Motic, Barcelona, Spanien
Bohrer	Presto II	NSK, Ratingen
Bohraufsatz	HM1 005 US1/4 FG	Meisinger, Neuss
Schwanenhals LED - Lampe	HighCri ZLED CLS4500	Zett Optics, Braunschweig
Chirurgischer Kopfbügelhalter	Stereotaxic Instrument for Mouse 68513	RWD Life Science, Dover, Delaware, USA
Wärmematte	ThermoStar Homeothermic Monitoring System	RWD Life Science, Dover, Delaware, USA
UV-Lampe	DEN01	Denest
Messschieber	Garant Messschieber Callper	Hoffmann Group, München
Rasierer	Rowenta Nomad	Groupe SEB, Frankfurt
Tupfer	Sugis	Kettenbach, Eschenburg
Gelfoam	Pfizer Gelfoam	Pfizer, Berlin
Kranielle Glasfenster	Menzel Gläser Deckgläser rund Ø4mm #1	Fisher Scientific, Schwerte
Kopfbügel	<p>Maßanfertigung:</p>  <p>Länge: 25 mm Breite: 10 mm Dicke: 1mm Gewicht: 0,4 g Einzelne Streben ~1 mm breit</p>	LaserJob, Fürstenfeldbruck
UV-Kleber	Venus Diamond Flow	Kulzer, Hanau
Gewebekleber	Histoacryl	B.Braun, Tuttlingen
Dentalzement	Paladur	Kulzer, Hanau
Augensalbe	Bepanthen Augen und Nasensalbe 5% Dexpanthenol	Bayer Vital, Leverkusen
Lokales Betäubungsmittel	Xylocain Gel 2%	Aspen Pharma Trading Limited, Dublin, Irland
Prämedikation/ Analgesie	Metacam (Meloxicam)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
	Vetalgin (Metamizol)	MSD Animal Health, München
Desinfektionsmittel	Braunol (Povidon-Iod)	B.Braun, Tuttlingen
	Ethanol 70% vergällt	Carl Roth, Karlsruhe

(Injektions-)Lösungen	Ringer-Lösung DAB 7	Serag Naila Wiessner,
	Isotonische NaCl 0,9%	Berlin Chemie, Berlin
Spritzen und Spitzen	Omnifix Solo	B.Braun, Tuttlingen
	Sterican 20Gx1/2	B.Braun, Tuttlingen
	Sterican 30Gx1/2	B.Braun, Tuttlingen
Zweiphotonmikroskopie		
Mikroskop		
Multiphoton Mikroskop	HyperScope	Scientifica, Uckfield, England
Laser	Mai Tai DeepSee Ti:Sapphire	Spectra-Physics, Darmstadt
LED Lichtquelle	pE-100	CoolLED, Andover, England
Objektiv	CFI75 LWD 16X W (NA 0.8; Arbeitsabstand 3 mm)	Nikon, Düsseldorf
Emissionsfilter	ET525/50: von 500 bis 550nm ET626/60: von 596 bis 656nm	Chroma, Bellows Falls, Vermont, USA
Software	Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench (LabVIEW)	National Instruments, Austin, Texas, USA
	MatLab	Mathworks, Natick, Massachusetts, USA
Mausanästhesie/ Narkosesystem	Isofluran Verdampfer	Northern Vaporisers, Skipton, England
	HSE MiniVac	Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten
Anästhetikum	Isofluran	Zoetis, Berlin
		CP-Pharma, Burgdorf
Monitoring des Versuchstieres	Small Animal Physiological Monitoring System	Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Immersiongel	Signa gel (1:1 verdünnt in demineralisiertem Wasser)	Parker Laboratories, Fairfield, New jersey, USA
Perfusion		
Peristaltische Pumpe	Peri-Star Pro	World Precision Instruments, Friedberg
Anästhetika	Imalgene 1000 (Ketamin)	Merial, Lyon
	Rompun 2% (Xylazin)	Bayer Vital, Leverkusen
Genotypisierung		
Zentrifuge	Mastercycler, Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg
	Biometric TRIO	Analytik Jena, Jena

Gelelektrophorese	Power PAC 200	Bio-Rad laboratories, Feldkirchen
	PerfectBlue Gelsystem + Kämme	PeqLab VWR, Darmstadt
Chemieluminiszenzsystem	Quantum	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Waage	AND EK-2000i	Smartlux, Born, Luxemburg
Molekülmassenstandard	Quick-Load 1kb DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Farbstoff	peqGreen DANN/RNA Dye	PeqLab VWR, Darmstadt
Primer	SOD-F 5'-CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA -3'	Eurofins Genomics, Konstanz
	SOD-R 5'-CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA-3'	Eurofins Genomics, Konstanz
Medium	Agarose 1%	Sigma-Aldrich, München
	TAE Puffer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA)	
PCR Lösung	GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix	Promega, Walldorf
Lösungen für den Verdau der organischen Probe	40mM TrisHCl	
	25mM NaOH	
Einmalprodukte	Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
	Biozym PCR SingleCap 8er-SoftStrips	Biozym, Hessisch-Oldendorf
	Clearline Pipet Tips	Kisker Biotech, Steinfurt
Gewebeschnitte und Immunologische Färbung (durchgeführt von Kan, VWY)		
Konfokal Mikroskop	TCS SP8	Leica Microsystems, Wetzlar
Objektiv	HC PL APO 20x/0.75 IMM CORR CS2 (NA 0.75; Arbeitsabstand 0,66 mm)	Leica Microsystems, Wetzlar
Kryostat	CM 1850	Leica Biosystems, Wetzlar
Einbettungsmedium	VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium (H-1000-10)	Vector Laboratories, Newark, California, USA
Multiwell- Platten	Greiner CELLSTAR® multiwell culture plates (48 wells)	Sigma Aldrich, München
Plattformschüttler	Unimax 2010	Heidolph Instruments, Schwabach
	SU1020	Sunlab Germany Sustainable Lab Instruments, Mannheim

Befestigungsmedium	VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium (H-1000-10)	Vector Laboratories, Newark, California, USA
Software zur Analyse		
Statistische Analyse	Prism	GraphPad Software, San Diego, California, USA
Bildanalyse	FiJi/ ImageJ	Open source (siehe [Eliceiri et al.])
	Excel	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
	MATLAB	MathWorks, Natick, Massachusetts, USA

Tab. 2: Materialliste

Wenn nicht anders beschrieben, befindet sich der Hersteller in Deutschland.

7 Methodenteil

7.1 Mausmodell

Die verwendete $SOD1^{G93A}$ transgene Mauslinie wurde über Jackson Laboratories erworben (B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)d11Gur/J; #002299) [Gurney et al., 1994]. Diese Mauslinie exprimiert eine mutierte, humane Form des Superoxiddismutase 1 Gens ($SOD1^{G93A}$). Im Vergleich zum Standardmodell (B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J; #004435) exprimiert dieser Stamm eine verringerte Anzahl an Kopien von SOD1 und weist einen verzögerten Erkrankungsbeginn auf [Alexander et al., 2004]. Heterozygote $SOD1^{G93A}$ Männchen wurden mit FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J (Jackson laboratories; #003718) [Oliva et al., 2000] Weibchen gekreuzt, welche das engl. enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) unter der Kontrolle des Glutamat Decarboxylase GAD67 Promoters exprimieren. Dadurch wird das eGFP in Zellen, die GABA produzieren, gebildet und im Zytosol angereichert. Riedemann et al. zeigten, dass nahezu alle dieser GFP positiven Zellen SOM IN sind [Riedemann et al., 2015].

Die Tiere wurden in der hauseigenen Tierhaltung, der Core Facility Animal Models (CAM; Großhaderner Str. 2, 82152 Planegg) gezüchtet. Ihnen stand Nahrung in Form von Pellets und Wasser ad libitum zur Verfügung. Alle Experimente wurden gemäß den geltenden Richtlinien der Regierung von Oberbayern ausgeführt (Lizenznummer 55.2-2532.Vet_02-16-11). Alle Experimente und Analysen wurden verblindet durchgeführt.

Kriterium	Klassifikation	Punktwert
Hinterbeintremor	nicht vorhanden	0
	Vorhanden	1
Hinterbeinextension Max. 5 sec langes Anheben der Maus an der Schwanzwurzel. Physiologischerweise beidseitig Unter- und Oberschenkel komplett extendiert und die Zehen gespreizt.	Physiologische Reaktion	0
	einseitige, inkomplette Extension	1
	beidseitige, inkomplette Extension	2
Aufrichtverhalten Max. 5 min langes Beobachten der Maus in einem separaten Käfig. Messung der Anzahl von kompletten Aufrichtmanövern an der Käfigwand mit kompletter Extension beider unterer Extremitäten.	Mindestens zwei komplette Aufrichtmanöver	0
	einmaliges, komplettes Aufrichten	1
	fehlende bzw. inkomplette Aufrichtmanöver	2
Schwanzhaltung 5 min langes Beobachten der Schwanzposition in Bezug zum Körper während Lokomotion.	Schwanz größtenteils auf Wirbelsäulenniveau oder höher und ohne Bodenkontakt	0
	Intermittierendes Absinken des Schwanzes mit Bodenkontakt	1
	Ausgeprägter Bodenkontakt bzw. Schleifen des Schwanzes	2

Tab. 3: SOD-Score

Diese Skala erfasst die motorischen Symptome der ALS bei Mäusen. Adjustiert nach [Gurney et al., 1994, Weydt et al., 2003].

Zur Klassifizierung der Symptome wurde ein spezifisches Punktesystem angewandt. Der mausspezifische SOD-Score umfasst vier Kategorien: Hinterbeintremor, Hinterbeinextension, das Aufrichtverhalten und die Position des Schwanzes während Lokomotion (siehe Tab. 3). Bei Erreichen der Maximalpunktzahl von 7 wird der Versuch beendet und das Tier euthanasiert. Zusätzlich darf das Körpergewicht max.

15% vom präoperativen Ausgangswert abnehmen, sonst ist auch hierdurch der engl. humane end point erreicht und das Tier muss sofort aus dem Experiment genommen und euthanasiert werden. Ab einem Alter von 5 Monaten muss jedes Tier auch ohne Eingriff wöchentlich untersucht werden. Zusätzlich gelten experimentabhängig eigene Intervalle, die jedoch nie größer als 1x/Woche sind.

Es wurden drei Alterskohorten untersucht: Eine juvenile, eine früh- und eine spätsymptomatische Kohorte. Grundsätzlich wurde jede Maus einen Tag vor der Operation dem später beschriebenen Gitter-Häng-Test unterzogen. Nach dem Eingriff standen die Tiere vier Wochen unter strenger Beobachtung, bevor das chronische *in vivo* Mikroskopieren begann. Dieses Intervall dient dem Zweck alle mit der Heilung verbundenen Entzündungsprozesse abzuwarten. Mikroskopiert wurden die Versuchstiere an insgesamt drei Untersuchungszeitpunkten im Abstand von je einer Woche. Danach wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis Isofluran (5 Vol%) euthanasiert. (siehe Abb. 8 und Tab. 4)

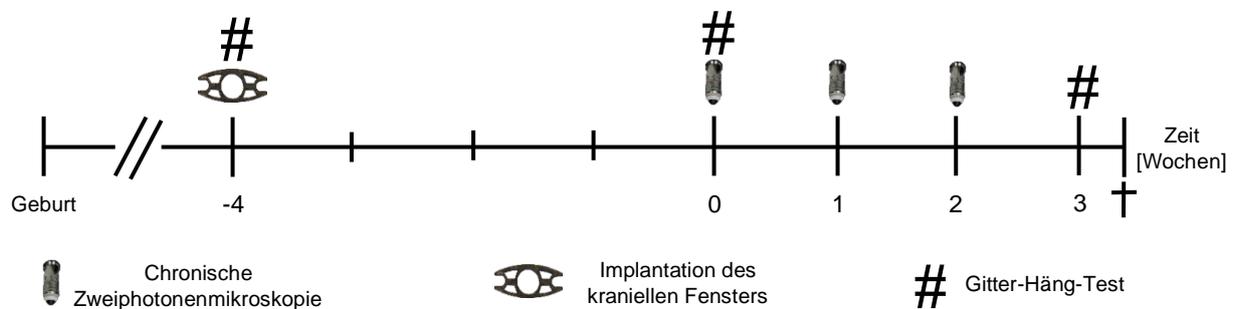


Abb. 8: Zeitstrahl Versuchsdesign

Abhängig von der zugeteilten Kohorte wurde dem Versuchstier das kranielle Fenster implantiert. Nach einer Schonzeit von vier Wochen begann das dreimalige Zweiphotonenmikroskopieren im Abstand von einer Woche. Zur Beobachtung der Kraftausdauer wurden die Mäuse vor dem operativen Eingriff, vor Start des Mikroskopieblocks und nach Beendigung der anderen Versuche mit dem Gitter-Häng-Test untersucht. Nach vollendeter Datenerhebung wurden die Tiere euthanasiert.

Kohorte	Alter Implantation kranielles Fenster [Monate]	Alter Beginn der chronischen <i>in vivo</i> Zweiphotonenmikroskopie [Monate]	Alter Euthanasie [Monate]
Präsymptomatische Kohorte	2	3	4
Frühsymptomatische Kohorte	4	5	6
Spätsymptomatische Kohorte	7	8	9

Tab. 4: Alter der Versuchskohorten

7.2 Operativer Eingriff: Implantation eines kraniellen Fensters

Sowohl die OP als auch das spätere Mikroskopieren wurden, wie anderweitig beschrieben [Holtmaat et al., 2009a], durchgeführt.

Eine halbe Stunde vor dem Eingriff wurde dem Tier die Prämedikation gegen Schmerzen oral appliziert (Meloxicam 1mg/kg Körpergewicht). Die Maus wird mit einer Kombination aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl (MMF; Medetomidin 0,5

mg/kg KG, Midazolam 5,0 mg/kg, Fentanyl 0,05 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) anästhesiert. Als nächstes wurde Augenschutz via Augensalbe mit 5% Dexpanthenol aufgetragen und die Maus auf die Wärmematte zum Erhalt der Körperkerntemperatur von 37°C platziert. Nach erfolgter Desinfektion des OP-Gebietes und Lokalanästhesie mit Lidocain-Gel 2% wird die Schädelkalotte durch Fellschnitt freipräpariert. Die verwendeten Utensilien umfassen das Motic SMZ 171 Operationsmikroskop zzgl. Ausleuchtung der Arbeitsfläche (HighCri ZLED CLS4500 von Zett Optics), den Fixateur des Mauskopfes RWD Life Science, zwei Pinzetten, eine Schere und einen Messschieber. Das Periost wird zusätzlich mit Lidocain-Gel 2% betäubt. Eine runde 4mm große Kraniotomie wurde mit dem Bohrer NSK Presto II, inklusive Bohraufsatz (HM1 005 US1/4 FG, Meisinger) angefertigt (Zentrum 0,8mm rostral und 1,7mm lateral von Bregma). Nach der Kraniotomie folgt das Einsetzen des Deckgläschens, welches mittels des UV-Klebers (Venus Diamond Flow von Kulzer) am Schädelknochen fixiert wird. Zuletzt erfolgt die Anbringung des Kopfhalters mit Dentalzement.

Postoperativ wurde den Mäusen Meloxicam (1mg/kg KG) oral an den folgenden drei Tagen je einmal verabreicht.

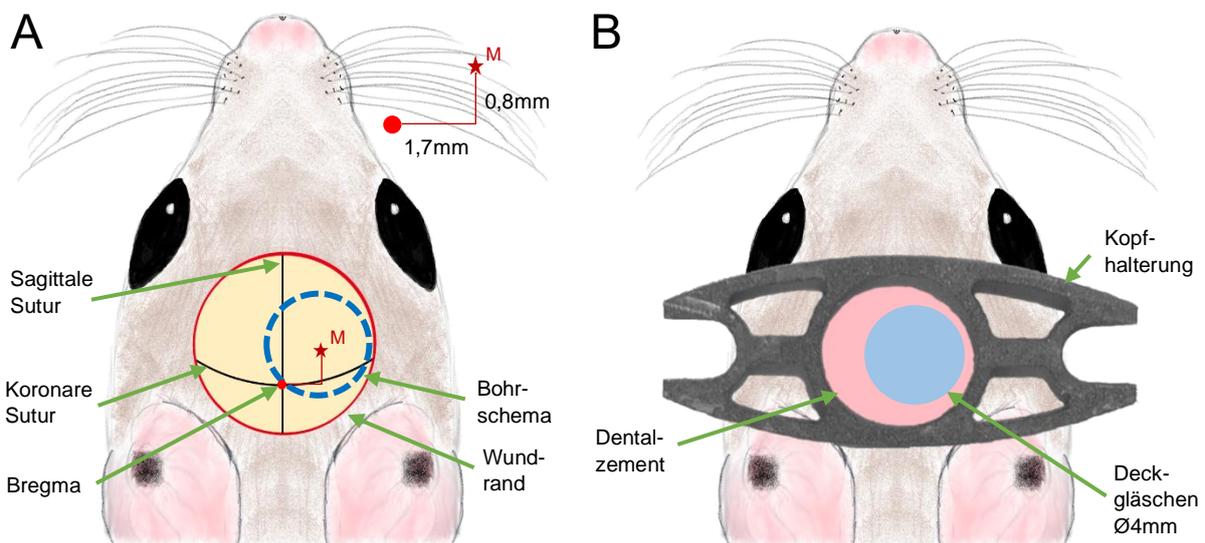


Abb. 9: Implantation des kraniellen Fensters

A: Skizze des OP-Situs nach Freilegung der Kalotte mit Position des Mittelpunktes M des Bohrschemas in Abhängigkeit zu Bregma.

B: Skizze des mit Dentalzement versiegeltem OP-Situs nach beendetem Eingriff

Aufgrund der Darstellbarkeit sind beide Abbildungen nicht maßstabsgetreu.

7.3 Gitter-Häng-Test

Mithilfe dieses Experiments wird die Kraftausdauer der Mäuse ermittelt [Bellantuono et al., 2020]. Hierfür wurde das Versuchstier ca. 40cm über dem gepolsterten Boden auf ein Gitter gesetzt. Dieser Versuch ist stark abhängig von der Motivation, der Angst, der Gewöhnung des Tieres an Versuch, Umgebung und Versuchsleiter und z.B. dem Gewicht bzw. dem Geschlecht des Tieres [Bellantuono et al., 2020]. Nach einigen Sekunden an Gewöhnungszeit wird das Gitter gedreht; das Versuchstier hängt folglich kopfüber. Es wird die Zeit gemessen, welche die Maus sich am Gitter festhält. Insgesamt drei Durchgänge werden im Abstand von mindestens 15 min durchgeführt. Außerdem wurde eine maximale Zeitspanne von 5 min definiert. Aus den drei Zeiten

wird der Medianwert verglichen. Um das Gewicht des Tieres als Störfaktor zu eliminieren, wird aus der gemessenen Zeit der Impuls der Maus berechnet:

$$\text{Impuls } I = \text{Erdbeschleunigung } g \times \text{Masse } m \times \text{Zeit } t$$

7.4 Chronische *in vivo* Zweiphotonenmikroskopie

Das Setup besteht aus dem HyperScope von Scientifica (resonanter Scanner von 8 kHz Resonanzfrequenz) und einem Ti:Sapphire Laser (MaiTai DeepSee, Spectra Physics) und dem Objektiv von Nikon: CFI75 LWD 16X W (NA 0,8; Arbeitsabstand 3mm).

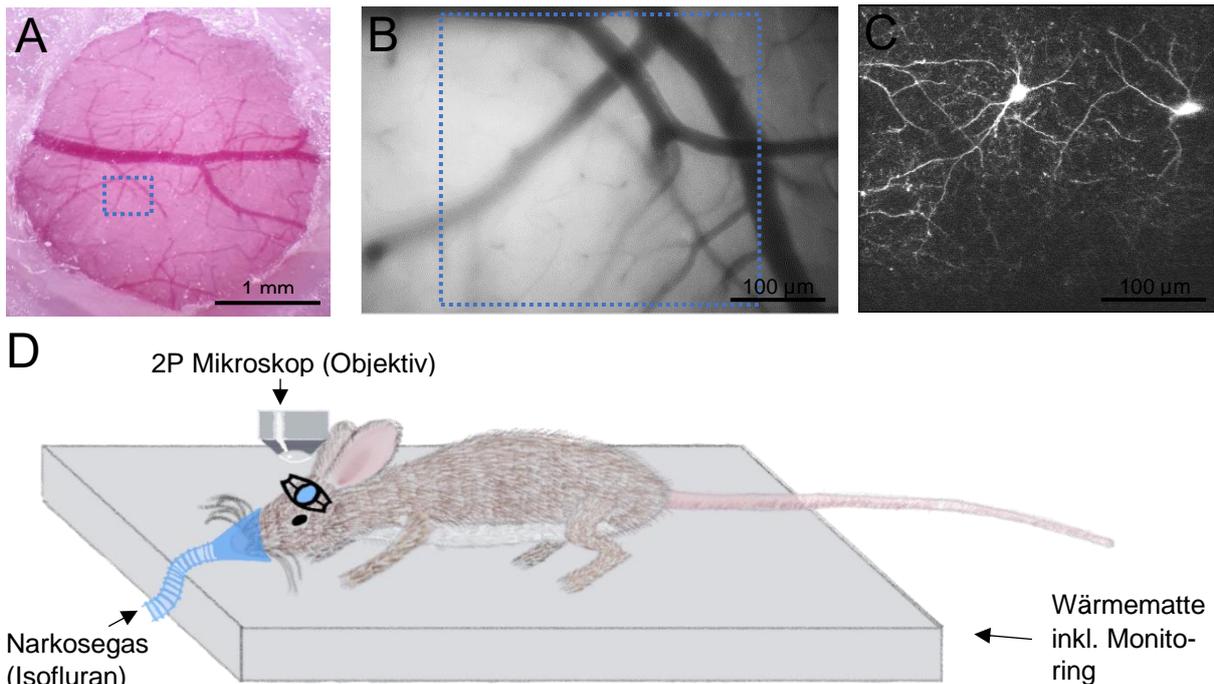


Abb. 10: *In vivo* Zweiphotonenmikroskopie

A: Repräsentatives Beispiel für ein Foto eines kraniellen Fensters mit sichtbaren kortikalen Gefäßen

B: Beispiel einer lichtmikroskopischen Übersichtsaufnahme der vaskulären Leitstrukturen

C: Beispiel einer 2P Fluoreszenz Übersichtsaufnahme der GABAergen IN

Die blauen Rechtecke markieren den Ausschnitt der nächsten Vergrößerungsstufe.

D: Das Versuchstier wurde nach Narkoseeinleitung und Applikation des Augenschutzes auf das Monitoringsystem gelagert. Nach Anbringung der Narkosemaske wurde mikroskopiert.

2P: Zweiphotonen

Vier Wochen nach erfolgreicher Implantation des kraniellen Fensters wurden die Mäuse in wöchentlichem Abstand mikroskopiert. Die Tiere wurden mit Isofluran anästhesiert (Einleitung 3 Volumen% in reinem O₂, Durchfluss 0,5l/min, bis zum Erlöschen der Reflexe ca. 3 min, danach Erhalt mit 1-2%) und mit Hilfe des physiologischen Monitoringsystems bei einer konstanten Körpertemperatur von 37°C gehalten. Respiratorisch wurde die Maus im Atemfrequenzbereich von 110-130/min stabilisiert. Oberflächliche Blutgefäße dienten als Orientierungsstruktur, um das mehrmalige Wiederauffinden der ausgewählten Zellen zu gewährleisten. Der Laser war zur Anregung von GFP auf eine Wellenlänge von 910nm eingestellt. Um potenzielle Bewegungsartefakte zu eliminieren wurden 100 Bilder der gleichen fokalen Ebene aufgenommen. Die Aufnahmen wurden in einer Auflösung von 512 x 512 Pixeln, bei 68 x 68 µm in xy, und einem axialen Abstand von 1 µm mit einer Bildrate von 30 Hz angefertigt. In jeder Maus wurden 2 bis 4 Regionen (engl. field of views, FOV)

aufgenommen. Übersichtsaufnahmen wurden mit einer Seitenlänge von 340 μm und einem z-Schritt von 5 μm gespeichert. Die Bilddateien wurden in einer kortikalen Tiefe von 150 bis 300 μm mit 30 bis 45 mW Laserleistung aufgenommen. (siehe Tab. 9 und Abb. 10)

7.5 Bildanalyse der *in vivo* Zweiphotonenmikroskopie-aufnahmen

Zur Eliminierung von geringfügigen Bewegungsartefakten (typischerweise hervorgerufen durch Atmung oder Blutgefäßpulsationen) werden je 100 Aufnahmen derselben Bildebene auf eine gemittelte Vorlage registriert und anschließend von diesen in x und y korrigierten Bildern eine gemittelte Projektion aller 100 Bilder pro Bildebene erstellt, welche für die Auswertung genutzt wurde. Der Matlab-basierte Algorithmus für die Bildbearbeitung wurde eigens hierfür im Labor entwickelt.

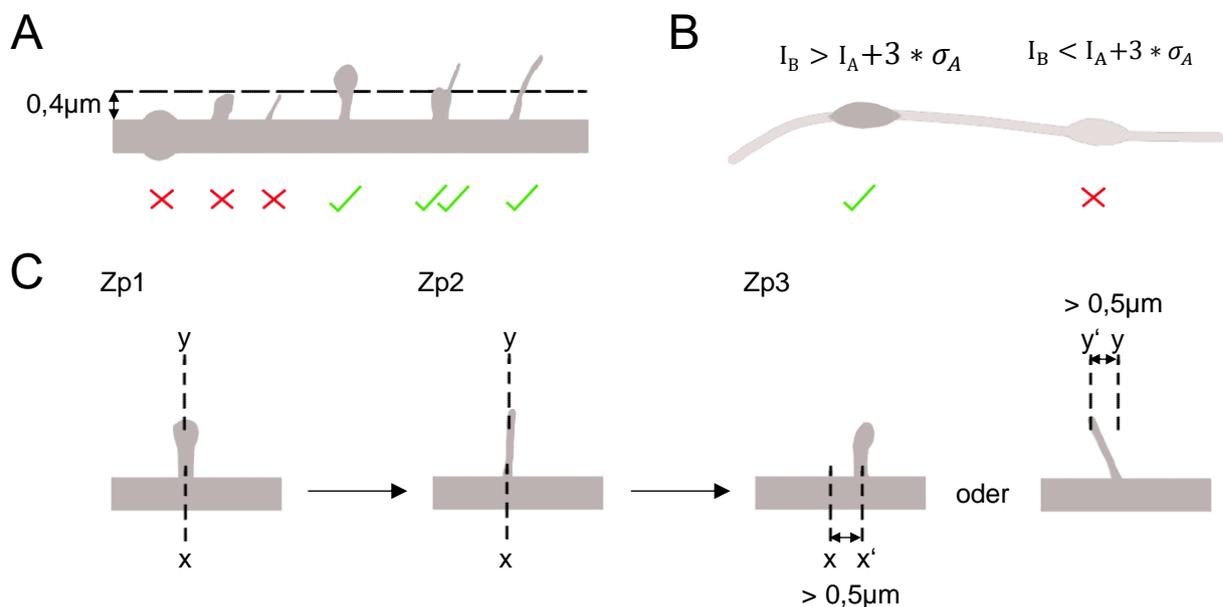


Abb. 11: Auswertekriterien

A: Spines müssen mindestens einen Schwellenwert von 0,4 μm Abstand von dem Dendriten übertreffen. Projektionsbedingt überlappende Dendriten werden einzeln gezählt.

B: Boutons deren durchschnittliche Intensität I_k größer als die durchschnittliche Intensität des Axons I_A addiert zur dreifachen Standardabweichung σ_A ist, werden gezählt.

C: Bei chronischer Veränderung der Form und Position der Basis oder des Kopfes des Dendriten um mindestens 0,5 μm wird dieser als neuer Spine gezählt. Der ursprüngliche Spine wird dann als verloren gewertet. Bei en passant Boutons wird nur die Verschiebung entlang des Axons beachtet.

Zpx: Zeitpunkt x [Holtmaat et al., 2009a]

Unter Verwendung von FiJi [Eliceiri et al.] (<https://imagej.net/software/fiji/downloads>) und des CellCounter Plugins wurden die synaptischen Strukturen (dendritische Dornen (Spines)/ axonale Knöpfchen (Boutons)) ausgezählt und mit Hilfe von Matlab Routinen ausgewertet. Für die Analyse von Spines und Boutons wurden folgende Kriterien angewandt (siehe Abb. 11 und Abb. 12) [Holtmaat et al., 2009a]: Spines müssen mindestens 0,4 μm lang sein (siehe Abb. 11A) und ihr Ansatz am Dendriten darf seine Position nicht um mehr als 0,5 μm über die Zeit verändern (siehe Abb. 11C). Boutons werden abhängig von der Intensität ausgewertet: Die Intensität der Boutons beträgt mindestens den Durchschnitt der Intensität des zugehörigen Axons plus der dreifachen Standardabweichung (siehe Abb. 11B).

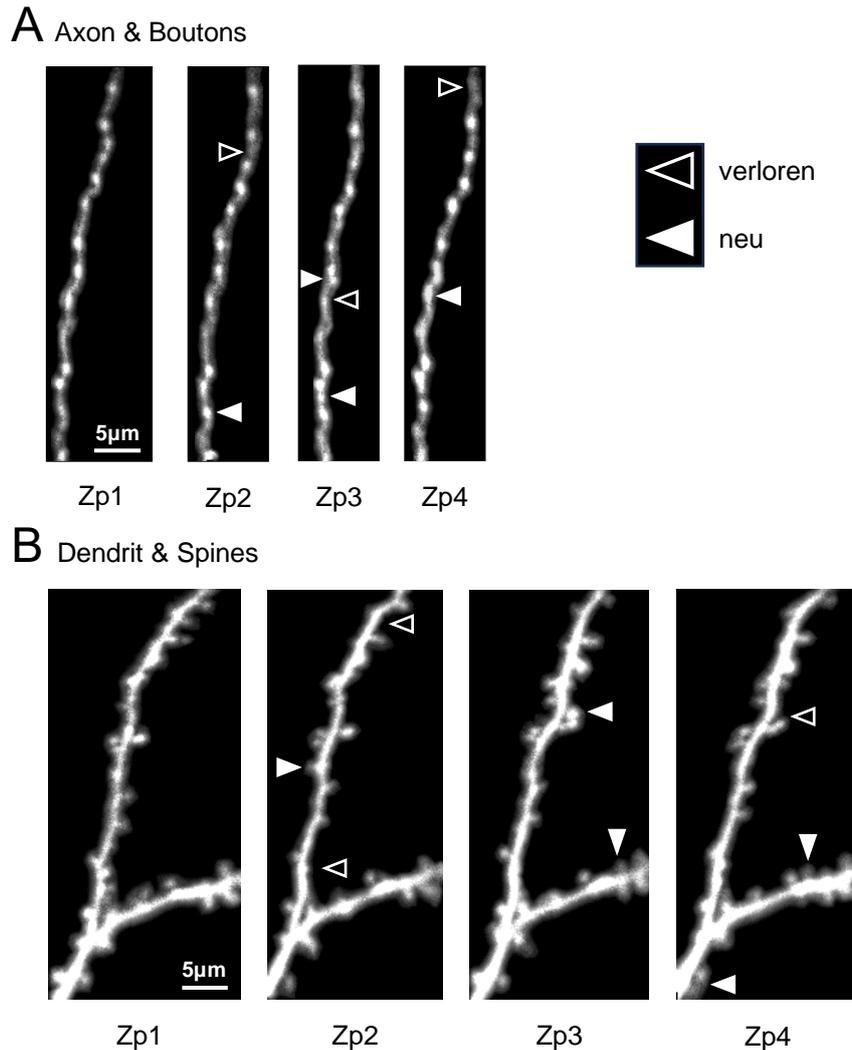


Abb. 12: Beispiel für das chronische Monitoring von axonalen Boutons und dendritischen Spines

A: Repräsentatives Beispiel für Boutons auf einem Axon (5-6mo, SOD)

B: Repräsentatives Beispiel für Spines auf einem gegabelten Dendriten (5-6mo, SOD)

In beiden Bildfolgen sind exemplarisch strukturelle Veränderungen dargestellt. Um die dreidimensionalen Zellfortsätze hier präsentieren zu können, wurden die Rohbildstapel anhand der Durchschnittsintensitäten in ein zweidimensionales Bild projiziert. Dies ist mit Qualitätsverlust verbunden. Aus illustratorischen Gründen wurden die Strukturen zusätzlich freigestellt. Zp_x: Zeitpunkt x

Um eine zuverlässige Dichte der synaptischen Strukturen ermitteln zu können, wurde die Mindestlänge der ausgewerteten Nervenzellfortsätze als 30 µm festgelegt. Chidambarama et al [Chidambarama et al., 2019] argumentieren, dass die Verteilung der Spines entlang des Dendriten unterschiedlich ist. De Paola et al berichteten von erhöhter struktureller Plastizität an den axonalen Enden [De Paola et al., 2006]. So definierten wir einen Mindestabstand von 50 µm vom Soma und 50 µm vom Ende der Dendriten bzw. Axone.

Neben der Dichte der Spines bzw. Boutons untersuchten wir auch folgende dynamische Parameter:

$$\text{Formationsrate (Zp}_x) = \frac{\text{neue Spines bzw. Boutons}}{\text{Gesamtanzahl Spines bzw. Boutons am Zp}_{x-1}}$$

$$\text{Verlustrate } (Zp_x) = \frac{\text{nicht wiederauffindbare Spines bzw. Boutons}}{\text{Gesamtanzahl Spines bzw Boutons am } Zp_{x-1}}$$

$$\text{Umsatzrate } (Zp_x) = \frac{\text{neue + nicht wiederauffindbare Spines bzw. Boutons}}{\text{Dichte der Spines bzw Boutons am } Zp_{x-1} \text{ und } Zp_x}$$

$$\text{Überlebensfraktion } (Zp_x) = \frac{\text{wiederauffindbare Spines bzw. Boutons des } Zp_0 \text{ am } Zp_x}{\text{Gesamtanzahl Spines bzw Boutons am } Zp_0}$$

7.6 Immunohistochemie

Vor Perfusion und Gewebeentnahme wurden die Versuchstiere von Vanessa W. Y. Kan mit Hydroxystilbamidin (Fluorogold, FG) in den Tractus coticospinalis im dorsalen Funiculus des zervikalen Rückenmarks injiziert, um CSMN in der kortikalen Schicht L5 retrograd zu markieren [Jara et al., 2014]. Die Mäuse wurden mit einer Überdosis von 100mg/kg Ketamin und 5mg/kg Xylazin i.p. terminal anästhesiert, danach mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,01 M phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) kardial perfundiert [Soueid et al., 2015] und das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel präpariert. Das Mausgehirn wurde über 3 Tage bei 4°C in 4% PFA postfixiert, anschließend in 30% Sucrose für weitere 72 Stunden, ebenfalls bei 4°C, dehydriert. Kryoschnitte von 60µm Dicke wurden an einem Kryostaten (Leica CM1850, Wetzlar) in koronarer Schnitfführung angefertigt.

Anschließend wurden die Gewebeschnitte in PBS mit 0,2% bovinem Serumalbumin, 5% Ziegen Serum, 0,2% Lysin und 0,2% Glycin geblockt, danach dreimalig je 5min gespült mit 0,5% Triton X-100 in PBS. Je nach Neuronenpopulation, die quantifiziert werden sollte, wurde die Inkubation der Gewebeschnitte mit spezifischen Antikörpern durchgeführt (siehe Tab. 5). Primäre Antikörper wurden 1:250 mit 0.3% Triton X-100, 2% bovinem Serumalbumin und PBS verdünnt, sekundäre 1:500 0.3% Triton X-100, 3% Ziegen Serum und PBS. Die Inkubationsdauer betrug im ersten Schritt mit den primären Antikörpern 72h, im zweiten mit den sekundären 24h. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte dreimal je 5min mit PBS gewaschen, schlussendlich die Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 1:10 000. Die Inkubationen wurden nach dem Ansetzen der jeweiligen Lösung im Unimax 2010 von Heidolph eingestellt auf ~150U/min bei 4°C und in Dunkelheit durchgeführt. Das Blocken der unspezifisch proteinbindenden Strukturen, die Färbung und die Waschvorgänge wurden bei Raumtemperatur im Sustainable Lab Instruments SU1020 bei ~70-80U/min vorgenommen.

Nach dem Eingießen ins Einbettungsmedium Vectashield von Vector Laboratories wurden mit dem Leica SP8 Konfokalmikroskop Bildaufnahmen angefertigt (Objektiv von Leica: HC PL APO 20x/0.75 IMM CORR CS2 (NA 0.75; Arbeitsabstand 0,66 mm), 752x752 pixel). Der sekundäre Antikörper zur Färbung der SOM wurde mit einer Wellenlänge von 561nm angeregt, der PV spezifische mit Licht mit einer Wellenlänge von 633nm. Die einzelnen Bilder weisen einen z Abstand von 3µm auf und erfassen insgesamt einen 30µm dicken Ausschnitt um die Koronarebenen 48, 52, 54, 58 und

60 (vgl. [AllenInstitute, Lein et al., 2007], Abstände von Bregma: -0,6mm, -0,3mm, 0mm, +0,3mm, +0,6mm, siehe Tab. 6). Alle Arbeitsschritte ab dem Anfertigen der Gewebeschnitte am Kryostaten bis zum digitalisierten Scan wurden von Kan, Vanessa W. Y. ausgeführt.

Funktion	Antikörper	Hersteller
Primärer Antikörper zur Färbung der SOM IN	Rat Anti-Somatostatin Antibody, clone YC7 (MAB354)	Sigma-Aldrich, München
Sekundärer Antikörper zur Färbung der SOM IN	Goat Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor 594) (ab150160)	Abcam, Cambridge, Massachussetts, USA
Primärer Antikörper zur Färbung der PV IN	Rabbit Anti-Parvalbumin antibody (ab11427)	Abcam, Cambridge, Massachussetts, USA
Sekundärer Antikörper zur Färbung der PV IN	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 647) (ab150079)	Abcam, Cambridge, Massachussetts, USA

Tab. 5: Zur Färbung verwendete Antikörper

IN: Interneuron, PV: Parvalbumin, SOM: Somatostatin, USA: Vereinigte Staaten von Amerika

7.7 Bildanalyse der Konfokalaufnahmen

Die Bildanalyse wurde mittels CellCounter Plugin in FiJi (open source, siehe [Eliceiri et al.]) durchgeführt. Sowohl M1 als auch S1 wurden separat analysiert [AllenInstitute, Lein et al., 2007]. Die Zelldichte der IN wurde getrennt für die kortikalen Schichten L2/3 und L5/6 bestimmt und im dreidimensionalen Bildstapel quantifiziert. Die Ergebnisse der weitgehend somafreien kortikalen Schicht L1 und der sehr dünnen Schicht L4 in S1 werden aufgrund der zu kleinen Grundvolumina hier nicht präsentiert. Zur Bestimmung der Areale von M1 bzw. S1 wurden folgende Maße aus dem „Allen Mouse Brain Atlas“ [AllenInstitute] entnommen (siehe Tab. 6 und Abb. 13A).

Koronar-ebene	Koronarer Abstand zu Bregma	a (Fissura longitudinalis cerebri bis Grenze M1/ S1)	b (Breite M1)	c (Kortexdicke bis zum Corpus callosum)
48	-600µm	2100µm	1200µm	1400µm
52	-300µm	2100µm	900µm	1700µm
54	0µm	1700µm	900µm	1400µm
58	300µm	1400µm	700µm	1500µm
60	600µm	1200µm	500µm	1500µm

Tab. 6: Maße der Kortizes entnommen aus dem „Allen Mouse Brain Atlas“ [AllenInstitute]

M1: primär motorischer Kortex, S1: somatosensorischer Kortex

Die verschiedenen isokortikalen Schichten wurden mit Hilfe einer unspezifischen DAPI und der Betz Zellen spezifischen FG Injektion für L5 manuell bestimmt. L2 und L3 bzw. L5 und L6 wurden aufgrund der konfokalmikroskopisch nicht erkennbaren Schichtgrenzen zusammengefasst verglichen. Die Zelldichte der IN Subgruppen wurde gemessen, indem die per Hand im dreidimensionalen Bildstapel bestimmte Anzahl im Verhältnis zum Volumen der Schicht gesetzt wurde. (siehe Abb. 13, Abb. 14)

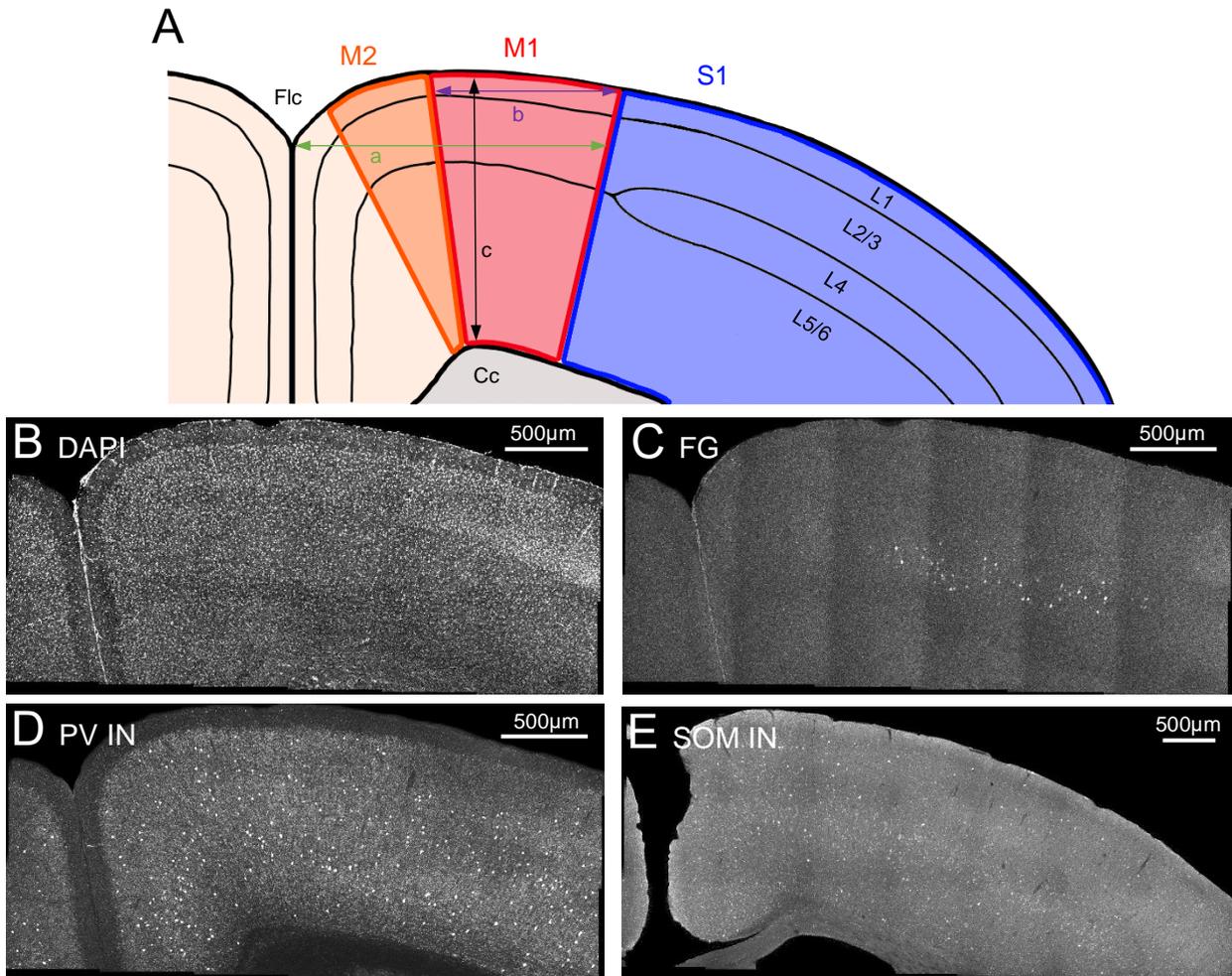


Abb. 13: Immunhistochemische Aufnahmen des Mauskortex

A: Schema der konfokalmikroskopischen Aufnahmen der untersuchten Kortizes [AllenInstitute] Cc: Corpus callosum, Flc: Fissura longitudinalis cerebri, Lx: isokortikale Schicht x, M1: Primärmotorischer Kortex, M2: prämotorischer Kortex, S1: somatosensorischer Kortex, a, b, c: Maße siehe Tab. 6

B: repräsentatives Beispiel einer Färbung mit DAPI (8-9mo, SOD)

C: repräsentatives Beispiel FG markierter oberer Motoneurone (8-9mo, SOD)

D: repräsentatives Beispiel einer PV IN Färbung (8-9mo, SOD)

E: repräsentatives Beispiel einer SOM IN Färbung (4-5mo, SOD)

DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, FG: Fluorogold/ Hydroxystilbamidin, PV IN: Parvalbumin exprimierende Interneurone, SOM IN: Somatostatin exprimierende Interneurone

Um Zellen von Artefakten oder Gefäßwänden abzugrenzen, wurden morphologische Charakteristika, wie Größe, Form und Sichtbarkeit von Zellfortsätzen geachtet (siehe Abb. 14).

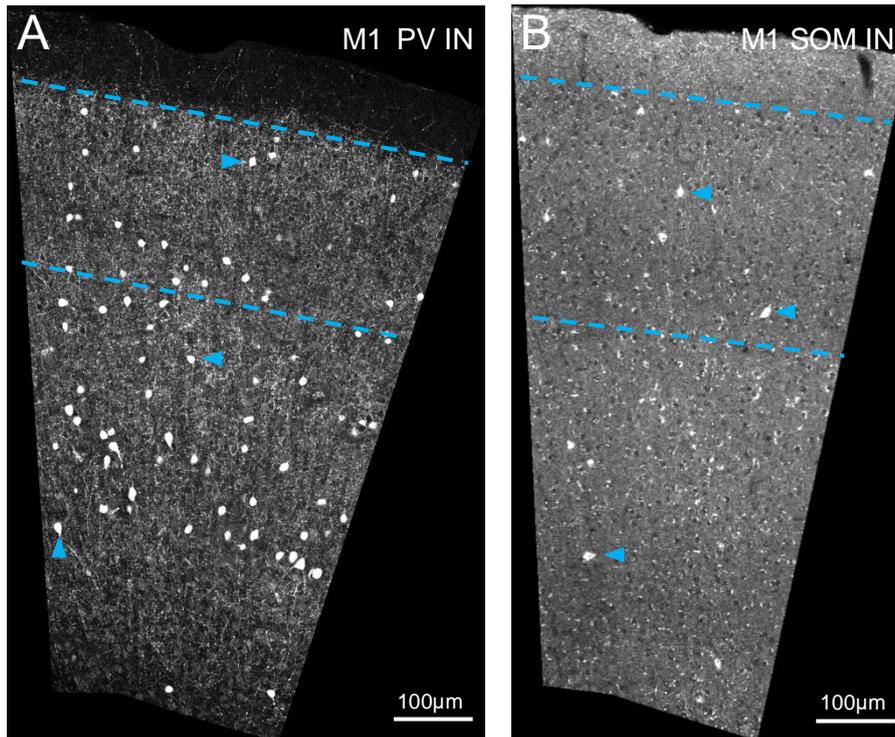
Abb. 14: Vergrößerung der konfokalen Aufnahme IN spezifischer Immunfärbungen

A: M1 in PV IN Färbung (8-9mo, SOD)

B: M1 in SOM IN Färbung (4-5mo, SOD)

Die blauen Pfeile markieren beispielhaft gefärbte IN. Mit gestrichelten Linien sind die ungefähren Schichtgrenzen zwischen L1, L2/3 und L5/6 veranschaulicht. Projektion der Rohbildstapel anhand der Durchschnittsintensitäten.

M1: primär motorischer Kortex, PV IN: Parvalbumin exprimierende Interneurone, SOM IN: Somatostatin exprimierende Interneurone, Lx: kortikale Schicht x



7.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Programmes Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA) durchgeführt. Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk Test (Graphpad Prism) verwendet. Wie jeweils angegeben stellen die Diagramme entweder die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) oder die Mediane \pm 95% Konfidenzintervalle (CI) dar. In den Diagrammen ausgezeichneten p-Werte sind die adjustierten Signifikanzniveaus aus den jeweiligen Messwiederholungen, im folgenden Post-hoc Test genannt.

Der zeitliche Verlauf des SOD Scores wurde mit dem X^2 Test untersucht (Graphpad Prism). Ergebnisse zur motorischen Kraftausdauer wurden zuerst einer ROUT (engl. robust regression and outlier removal) Ausreißerelimination (Q=10%; Graphpad Prism) und danach mit zweifaktoriellen Varianzanalyse (engl. Two way ANOVA, 2w ANOVA; Graphpad Prism) und Post-hoc Test Sidak bewertet. Geschlechtsspezifische Effekte im ALS- assoziierten Kraftverfall hingegen wurden mit 2w ANOVA und dem Post-hoc Test Fisher's LSD (engl. least significant difference; Graphpad Prism) ausgewertet. Die schichtspezifischen IN Zelldichten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließend nach Dunn (Graphpad Prism) statistisch geprüft. Datenreihen mit mehreren Messzeitpunkten aus dem *in vivo* 2P Mikroskopieversuch zur Untersuchung der strukturellen Plastizität der SOM IN wurden mit Hilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen (engl. two way repeated measurements ANOVA, 2w rm ANOVA; Graphpad Prism) und Post-hoc Test Sidak getestet.

8 Ergebnisse

8.1 Klinisches Erscheinungsbild und Kraftausdauer des Mausmodells

Zunächst wurde eine Beurteilung des Krankheitsstadiums und der motorischen Einschränkung der *SOD1^{G93A}* Tiere durchgeführt. Hierfür wurde der SOD-Score (siehe Tab. 3) und die muskuläre Kraftausdauer mittels Gitter-Häng-Test (siehe 7.3) vor der Operation, vor Beginn der chronischen 2P Mikroskopie und ein letztes Mal vier Wochen später (siehe Abb. 8) evaluiert. Im Folgenden wird die Kontrollgruppe als Wildtyp (WT) bzw. die Gruppe mit ALS Erkrankung als SOD bezeichnet.

8.1.1 SOD Mäuse zeigen ab 6 Monaten klinisch auffällige Motorik.

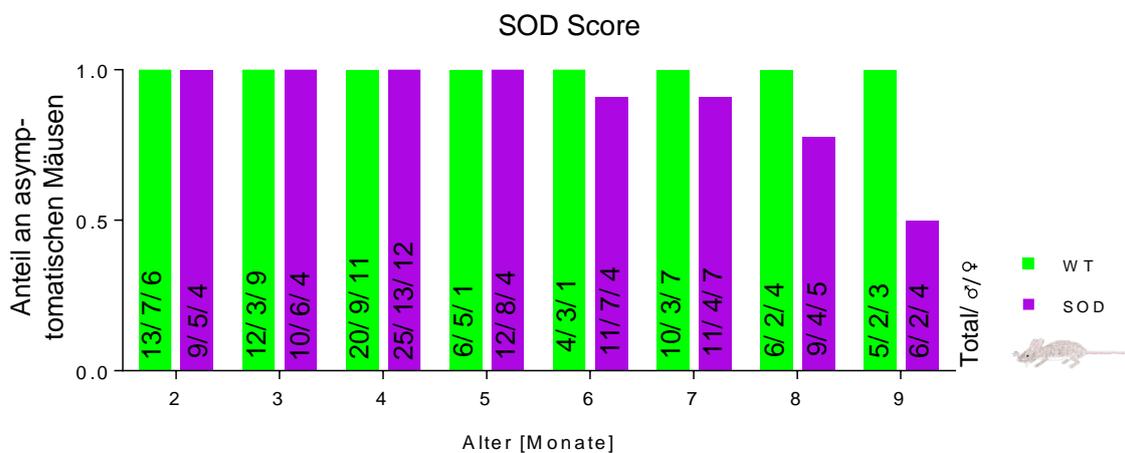


Abb. 15: Altersabhängiger Verlauf des SOD Score

Darstellung des Anteils asymptotischer Tiere abhängig von ihrem Genotyp und Alter. In der Basis der Balken wird n abhängig vom Geschlecht angegeben.

Daten entsprechen Mittelwerten; χ^2 Test; m.o.: Monate alt, n : Grundgesamtheit, WT: Wildtyp, SOD: transgene Tiere

Alle Mäuse wurden regelmäßig klinisch evaluiert und nach dem SOD Score bewertet (siehe 7.1 und Abb. 15). Zunächst wurde der Anteil asymptotischer Tiere in beiden Gruppen über die Zeit beurteilt. Als symptomatisch gelten hierbei alle Mäuse, die mit mindestens einem Punkt im SOD Score bewertet wurden. Die Tiere zum Zp-4 wurden noch nicht implantiert. Ab einem Alter von 6 Monaten zeigten die ersten männlichen Tiere der SOD Gruppe Symptome (siehe Abb. 15). Allerdings waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen der einzelnen Altersgruppen messbar. Die geringe Grundmenge konnte nur einen Trend der neunmonatigen Tiere zeigen ($p=0,0637$, χ^2 Test, $n_{WT}=5$, $n_{SOD}=6$). Tiere, die die Kriterien des humanen Endpunktes (siehe 7.1) erfüllten oder nicht mehr an der 2P Versuchsreihe teilnehmen konnten, mussten aus den Versuchen ausscheiden.

8.1.2 SOD Tiere weisen altersabhängig eine Reduktion der Kraftausdauer auf.

Neben dem klinischen Erscheinungsbild im SOD Score wurde auch die Kraftausdauer mit Hilfe des Gitter-Häng-Tests untersucht. Nach Ausreißerelimination mit ROUT (Q= 10%) zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der gemessenen Zeit der ältesten Kohorte (Abb. 16A, 2w ANOVA: Alter $F(2,62)= 17,09$, $p<0,0001$; Genotyp $F(1,62)= 5,195$, $p=0,0261$; Interaktion $F(2,62)= 1,902$, $p=0,1579$; Sidak_{8-9mo}: $p=0,0283$, $n_{3-4WT}= 13$, $n_{3-4SOD}= 9$, $n_{5-6WT}= 11$, $n_{5-6SOD}= 16$, $n_{8-9WT}= 10$, $n_{8-9SOD}= 11$). Beim Vergleich der Impulswerte ergab sich ebenfalls eine signifikant erniedrigte Kraftausdauer der SOD Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 16B, 2w ANOVA: Alter $F(2,63)= 10,05$, $p=0,0001$; Genotyp $F(1,63)= 6,304$, $p=0,0146$; Interaktion $F(2,63)= 3,898$, $p=0,0253$; Sidak_{8-9mo}: $p=0,0037$). Zum Zp-4 sind die Mäuse noch nicht der Fensterimplantation unterzogen worden (siehe 7.1, Tab. 4). In den anderen Kohorten resultierten keine signifikanten Unterschiede im Post-hoc Test.

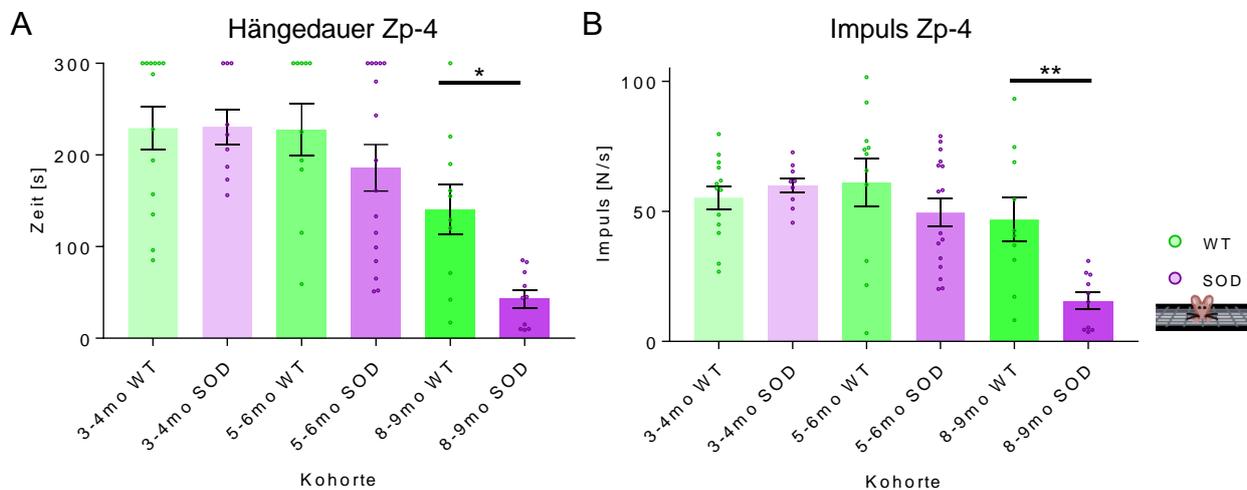


Abb. 16: Muskuläre Kraft ist reduziert in symptomatischen SOD Mäusen

A: Hängedauer im Gitter-Häng-Test vor der Fensterimplantation

B: Impuls im Gitter-Häng-Test vor der Fensterimplantation

Daten entsprechen Mittelwert \pm SEM; 2w ANOVA + Sidak: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; SOD: transgene Tiere, WT: Wildtyp, Zp-4: Zeitpunkt -4 (vor der Fensterimplantation)

Das Geschlecht und das Alter ist ein anerkannter Einflussfaktor im Versuchsprotokoll des Gitter-Häng-Tests [Bellantuono et al., 2020]. Deshalb wurde die Geschlechtszugehörigkeit untersucht. Um die Operation als Störvariable zu eliminieren, wurden die weiteren statistischen Berechnungen nur mit Mäusen aus dem Zp-4 vorgenommen. In allen drei Alterskohorten zeigte sich bei Anwendung der 2w ANOVA ein genotypunabhängiger signifikanter Unterschied zwischen weiblichen (W) und männlichen (M) Versuchstieren, aber auch beim Faktor Alter: Sowohl in der Zeitmessung (WT Tiere (2w ANOVA, Geschlecht $F(1,27)= 24,47$, $p<0,0001$; Alter $F(2,27)= 9,535$, $p=0,0007$; Interaktion $F(2,27)= 0,0450$, $p=0,9561$); $n_{3-4}(M/W)= 7/6$, $n_{5-6}(M/W)= 7/4$, $n_{8-9}(M/W)= 3/7$; SOD Tiere (2w ANOVA, Geschlecht $F(1,26)= 121,1$, $p<0,0001$; Alter $F(2,26)= 142$, $p<0,0001$; Interaktion $F(2,26)= 19,96$, $p<0,0001$); $n_{3-4}(M/W)= 5/4$, $n_{5-6}(M/W)= 8/8$, $n_{8-9}(M/W)= 4/7$) als auch der gewichtsbereinigten Impulsberechnung (WT Tiere (2w ANOVA, Geschlecht $F(1,27)= 8,646$, $p=0,0066$; Alter $F(2,27)= 3,628$, $p=0,0402$; Interaktion $F(2,27)= 0,9119$, $p=0,4138$); SOD Tiere (2w

ANOVA, Geschlecht $F(1,29)= 20,65$, $p<0,0001$; Alter $F(2,29)= 55,46$, $p<0,0001$, Interaktion $F(2,27)= 9,703$, $p=0,0006$)).

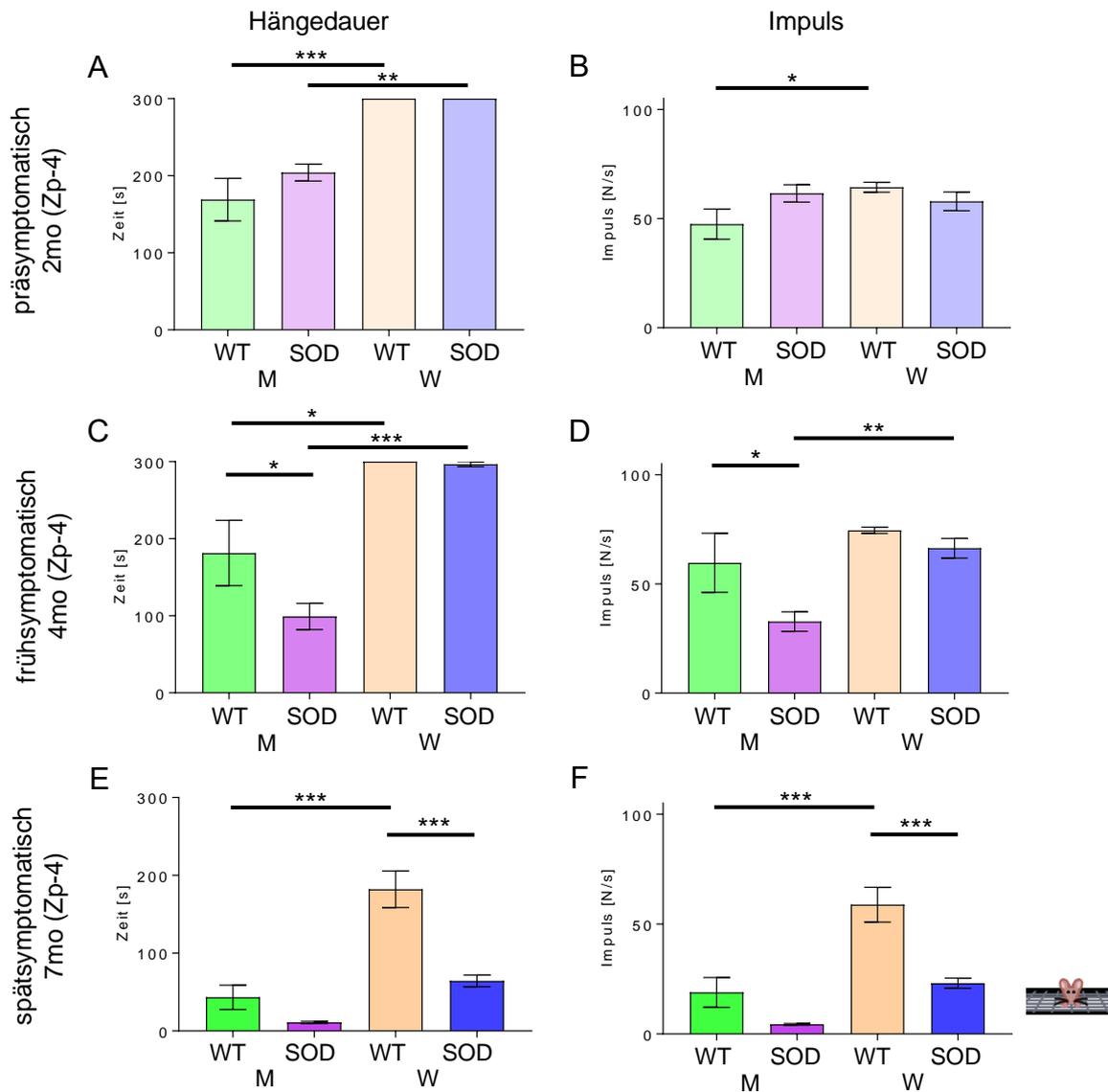


Abb. 17: Geschlechtsunterschiede im Gitter-Häng-Tests

Darstellung der geschlechtsspezifischen Daten der Hängedauer (A, C, E) und Impulse (B, D, F) geordnet nach Alter. Alle hier angegebenen Signifikanzniveaus sind Ergebnis des Fisher's LSD nach 2w ANOVA. Daten entsprechen Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; M: Männlich, W: Weiblich, WT: Wildtyp, SOD: transgene Tiere, Zp-4: Zeitpunkt -4 (vor der Fensterimplantation)

Männchen und Weibchen in der präsymptomatischen Kohorte weisen signifikante Unterschiede der Hängedauer zwischen den beiden Geschlechtern innerhalb der Genotypen (2w ANOVA, Geschlecht $F(1,17)= 30,19$, $p<0,0001$; Genotyp $F(1,17)= 0,7271$, $p=0,4057$; Interaktion $F(1,17)= 0,7271$, $p=0,4057$, $n_{WT}(M/W)= 7/6$, $n_{SOD}(M/W)= 5/4$, Fisher's LSD: $p_{WT}<0,0001$, $p_{SOD}=0,0096$) auf, jedoch keine zwischen den Genotypen innerhalb eines Geschlechts (siehe Abb. 17A). Der Impuls war signifikant größer in der Gruppe der weiblichen WT gegenüber den männlichen (2w ANOVA, Geschlecht $F(1,18)= 1,552$, $p=0,2288$; Genotyp $F(1,18)= 0,4854$, $p=0,4854$; Interaktion $F(1,18)= 3,742$, $p=0,0689$, Fisher's LSD: $p_{WT}=0,0227$) (siehe Abb. 17B). Frühsymptomatische SOD Männchen waren schwächer als ihre Kontrollgruppe anhand der Hängedauer (2w ANOVA, Geschlecht $F(1,20)= 28,32$, $p<0,0001$; Genotyp $F(1,20)= 2,078$, $p=0,4057$; Interaktion $F(1,20)= 1,767$, $p=0,1978$, $n_{WT}(M/W)= 7/4$,

$n_{SOD}(M/W) = 8/8$, Fisher's LSD: $p_M = 0,0294$) (siehe Abb. 17C). Auch hier war ein Effekt des Geschlechts im Post-hoc Fisher's LSD nachweisbar (Zeit: $p_{WT} = 0,0197$, $p_{SOD} < 0,0001$) (siehe Abb. 17C). Die Impulswerte der Männchen der frühsymptomatischen Kohorte bestätigen einen Kraftausdauerverlust in Abhängigkeit von der SOD Mutation (2w ANOVA, Geschlecht $F(1,22) = 7,16$, $p = 0,0138$; Genotyp $F(1,22) = 0,0657$, $p = 0,4057$; Interaktion $F(1,22) = 1,07$, $p = 0,3122$, Fisher's LSD: $p_M = 0,0229$) (siehe Abb. 17D). Transgene Männchen sind stärker betroffen als ihre weiblichen SOD Gegenstücke ($p_{SOD} = 0,0045$) (siehe Abb. 17D). In der spätsymptomatischen Kohorte war sowohl in der gemessenen Zeit (2w ANOVA, Geschlecht $F(1,16) = 25,05$, $p = 0,0001$; Genotyp $F(1,16) = 15,29$, $p = 0,0012$; Interaktion $F(1,16) = 4,957$, $p = 0,0407$, $n_{WT}(M/W) = 3/7$, $n_{SOD}(M/W) = 4/7$, Fisher's LSD: $p_W < 0,0001$, $p_{WT} = 0,0001$) als auch der Impulsberechnung (2w ANOVA, Geschlecht $F(1,16) = 20,02$, $p = 0,0004$; Genotyp $F(1,16) = 14,69$, $p = 0,0015$; Interaktion $F(1,16) = 2,634$, $p = 0,1241$, Fisher's LSD: $p_W = 0,0003$, $p_{WT} = 0,0007$) ein ALS assoziierter Effekt bei den weiblichen Tieren und auch innerhalb der WT Gruppe messbar (siehe Abb. 17E-F). (siehe Tab. 7)

Alterskohorte	Genotyp	Geschlecht	Anzahl Mäuse
Präsymptomatisch (3-4mo)	WT	M	3
		W	7
	SOD	M	5
		W	4
Frühsymptomatisch (5-6mo)	WT	M	7
		W	4
	SOD	M	8
		W	8
Spätsymptomatisch (8-9mo)	WT	M	7
		W	6
	SOD	M	4
		W	7

Tab. 7: Geschlechterverteilung der untersuchten Tiere präoperativ
 WT: Wildtyp, SOD: transgene Tiere, M: männlich, W: weiblich, mo: Monate alt

Die sieben Monate alten, spätsymptomatischen SOD Weibchen erlitten eine signifikante Reduktion der Kraftausdauer (Abb. 17E-F). Männliche Mäuse waren bereits in der frühsymptomatischen Kohorte von den motorischen Symptomen der ALS geschwächt (Abb. 17C-D). Interessanterweise sind die statistischen Ergebnisse der spätsymptomatischen Männchen nicht signifikant. Es zeigt sich jedoch ein Trend hinweisend auf einen Kraftausdauerverlust der transgenen Tiere (Abb. 17E-F).

8.2 Zelldichte der PV und SOM IN

ALS ist eine neuronale Erkrankung mit nachgewiesener Degeneration der CSMN und SMN (siehe 4.1). Aufgrund der Hinweise auf eine Beteiligung der kortikalen IN auf die Pathogenese der ALS (siehe 4.1.3) ist eine Messung der Zelldichte der IN interessant. Neben M1 haben wir auch die IN Zelldichte in S1 ermittelt, da im Mäusegehirn in S1 auch CSMN nachgewiesen werden konnten [Lemon, 2008, Macías et al., 2022, Suter et al., 2015, Ueno et al., 2018]. Zu diesem Zweck wurden Hirnschnitte angefertigt, gefärbt und danach die IN schichtspezifisch ausgezählt. Es wurde eine adoleszente Kohorte im Alter von 4-5 Monaten mit einer spätsymptomatischen Kohorte im Alter von 8-9 Monaten mit jeweils einer SOD und einer WT Gruppe verglichen (siehe Tab. 8). Die weitgehend somafreie kortikale Schicht 1 (L1) und die sehr dünne Schicht 4 (L4) in S1 wurden aufgrund zu kleiner Grundvolumina nicht ausgewertet.

IN	Alterskohorte	Genotyp	Sektionen	Mäuse
PV IN	Adoleszent (4-5mo)	WT	12	3
		SOD	8	2
	Spätsymptomatisch (8-9mo)	WT	9	3
		SOD	11	4
SOM IN	Adoleszent (4-5mo)	WT	9	3
		SOD	6	3
	Spätsymptomatisch (8-9mo)	WT	6	2
		SOD	15	5

Tab. 8: Anzahl an auswertbaren Sektionen

IN: Interneuron, mo: Monate alt, PV: Parvalbumin, SOM: Somatostatin, WT: Wildtyp, SOD: transgene Mauslinie

8.2.1 Die PV IN Zelldichte ist nicht verändert

Die Ergebnisse via Kruskal-Wallis Test und post-hoc nach Dunn konnten keine signifikanten Auswirkungen der ALS assoziierten Mutation auf die Dichte der PV IN aufzeigen, weder in M1 noch in S1 (siehe Abb. 18). Hier könnten Untersuchungen von strukturellen oder funktionellen Eigenschaften der PV IN weitere Erkenntnisse bringen.

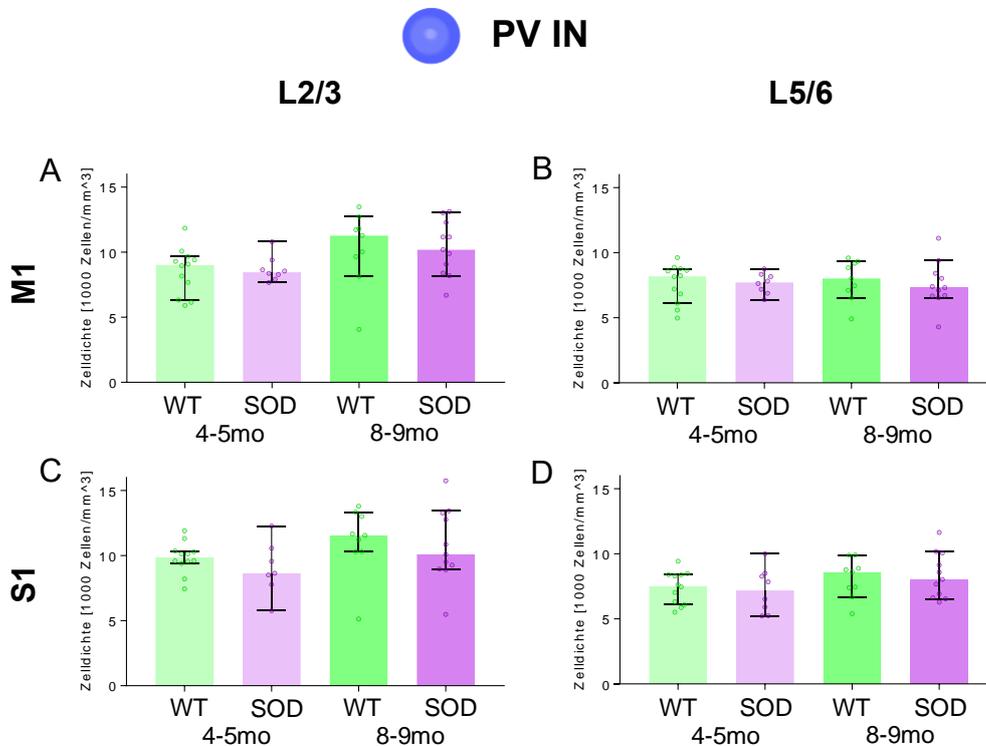


Abb. 18: PV IN Dichte

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Kruskal Wallis + Dunn's) abhängig vom Genotyp der Mäuse. Datenpunkte entsprechen den einzelnen Sektionen, dargestellt als Median \pm 95% CI. Abgebildet sind die PV IN Dichten in M1 (A, B) und S1 (C, D) in L2/3 (A, C) bzw. L5/6 (B, D).

PV IN: Parvalbumin exprimierende Interneurone, Lx: isokortikale Schicht x, WT: Wildtyp, SOD: SOD transgene Mauslinie, M1: primär motorischer Kortex, S1: somatosensorischer Kortex

8.2.2 Die SOM IN Dichte ist altersabhängig reduziert

Auch die SOM IN Dichte verändert sich nicht ALS assoziiert. In den Schichten L2/3 der frühsymptomatischen Kohorte zeigt sich ein nicht signifikanter Trend einer in transgenen Mäusen verringerten SOM IN Zelldichte in S1 (Kruskal-Wallis + Dunn, $p=0,1571$, n_{WT} (Mäuse/ Sektionen)= 3/12, n_{SOD} (Mäuse/ Sektionen)= 2/8; siehe Abb. 19C, Tab. 8).

Es zeigt sich ein signifikanter Effekt des Alters der Versuchstiere auf die Zelldichte, v.a. der Wildtiere: In L2/3 des M1 (Kruskal-Wallis + Dunn, $p=0,0005$, n_{4-5} (Mäuse/ Sektionen)= 3/12, n_{8-9} (Mäuse/ Sektionen)= 3/9, siehe Abb. 19A, Tab. 8) als auch S1 (Kruskal-Wallis + Dunn, $p_{L2/3}=0,0014$, siehe Abb. 19C; $p_{L5/6}=0,0070$, siehe Abb. 19C, D, Tab. 8) zeigt sich ein Verlust der SOM IN im Verlauf des Alterungsprozesses. Die transgenen Tiere zeigen den selben Verlauf nur in L2/3 im M1 (Kruskal-Wallis + Dunn, $p=0,0080$, n_{4-5} (Mäuse/ Sektionen)= 2/8, n_{8-9} (Mäuse/ Sektionen)= 5/15, siehe Abb. 19C, Tab. 8).

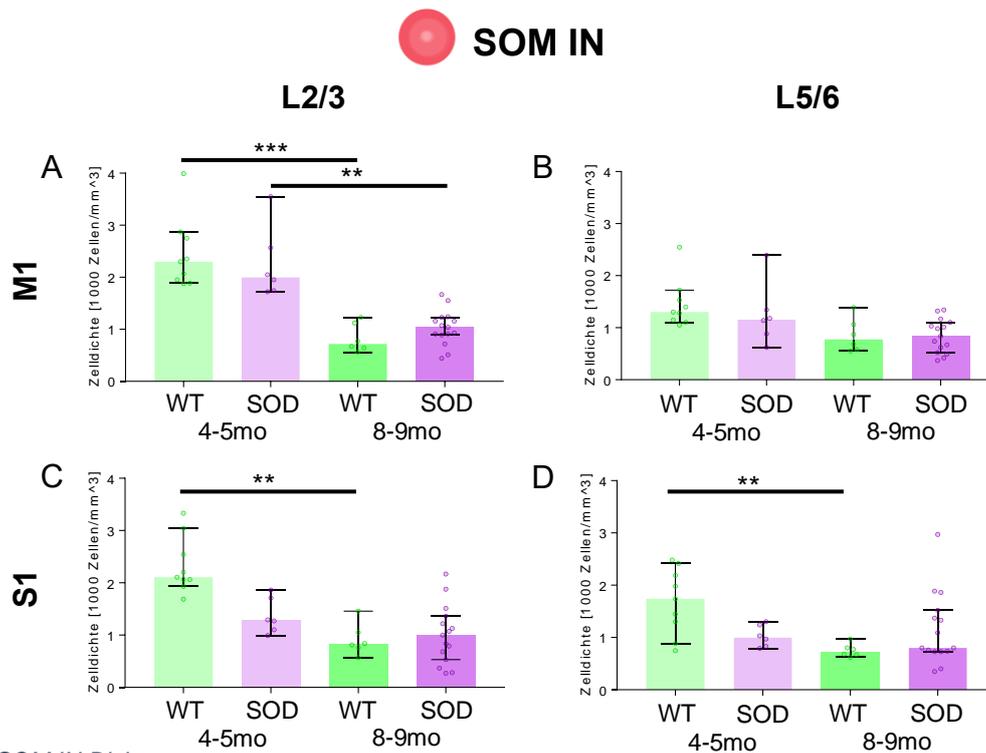


Abb. 19: SOM IN Dichte

Abgebildet sind die SOM IN Dichten in M1 (A, B) und S1 (C, D) in L2/3 (A, C) bzw. L5/6 (B, D). Es zeigte sich ein nicht signifikanter Trend abhängig vom Genotyp in L2/3 des S1 (C). Zusätzlich ist ein Alterungseffekt v.a. bei den Wildtieren messbar (A, C, D). Alle hier angegebenen Signifikanzniveaus sind Ergebnis des Dunn Post-Hoc Tests nach Anwendung des Kruskal Wallis Tests. Die Datenpunkte entsprechen den einzelnen ausgewerteten Sektionen; dargestellt sind der jeweilige Median \pm 95% CI, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

PV IN: Parvalbumin exprimierende Interneuronen, Lx: isokortikale Schicht x, WT: Wildtyp, SOD: transgene Mauslinie, M1: primärer motorischer Kortex, S1: somatosensorischer Kortex

8.3 Strukturelle Plastizität der SOM IN während der Pathogenese der ALS

Neurone können trotz unveränderter Dichte auch strukturell oder funktionell verändert sein. Die strukturelle Plastizität ist ein sensibler Parameter für die Unversehrtheit eines Neurons und wurde hier mittels chronischer *in vivo* Zweiphotonenmikroskopie im primär motorischen Kortex an SOD Tieren erfasst.

Alterskohorte	Präsymptomatisch (3-4mo)		Frühsymptomatisch (5-6mo)		Spätsymptomatisch (8-9mo)	
	WT	SOD	WT	SOD	WT	SOD
Genotyp	WT	SOD	WT	SOD	WT	SOD
Dendriten	50	29	33	39	35	33
Axone	65	37	48	44	42	46
Mäuse	7(1M/6W)	7(4M/3W)	7(4M/3W)	7(5M/2W)	7(4M/3W)	6(3M/3W)

Tab. 9: Quantität der mikroskopierten Strukturen

WT: Wildtyp, SOD: transgene Tiere, M: männlich, W: weiblich, mo: Monate alt

8.3.1 Interneurone in SOD Tieren weisen Veränderungen der Spine Dichte auf.

Die Dichte beschreibt die durchschnittliche Anzahl der postsynaptischen Strukturen pro μm Dendrit. In der präsymptomatischen Kohorte zeigte sich eine geringere Dichte an Spines in der SOD Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren (2w rm ANOVA, Zeit $F(2,154)=1,066$, $p=0,3469$; Genotyp $F(1,77)=5,779$, $p=0,0186$; Interaktion $F(2,154)=2,267$, $p=0,1070$, Sidak: $p_{z_{p0}}=0,0369$, $p_{z_{p1}}=0,0308$, $n_{WT}(\text{Mäuse/ Dendriten})=7/50$, $n_{SOD}(\text{Mäuse/ Dendriten})=7/29$, Abb. 20A, Tab. 9). Am Z_{p2} stagniert der Unterschied zwischen WT und SOD Gruppe und wird nicht signifikant. Die Ergebnisse der frühsymptomatischen und spätsymptomatischen Kohorte waren nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abb. 20C, E, Abb. 21 und Tab. 9).

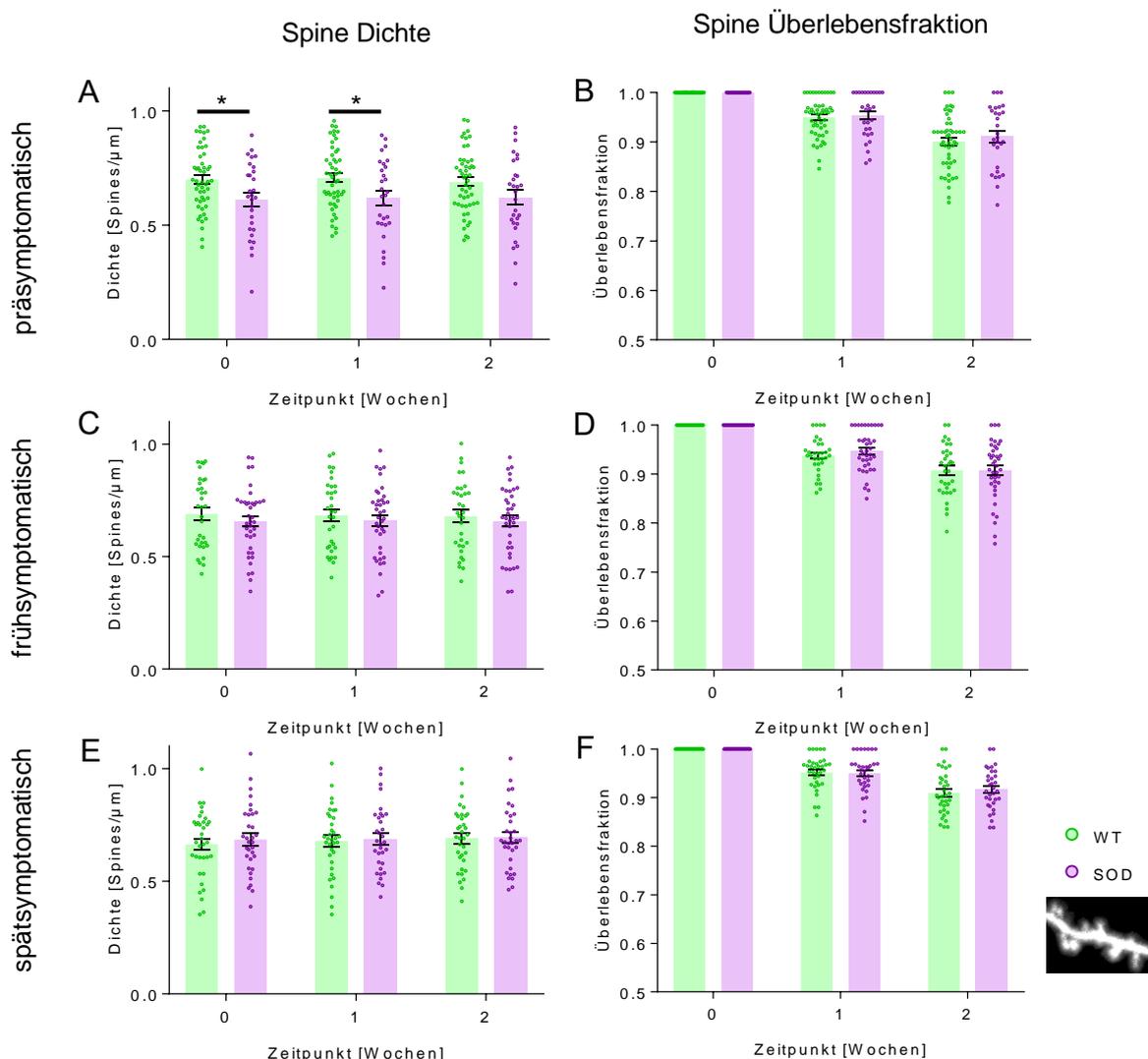


Abb. 20: Dichte und Umsatzrate von dendritischen Spines von SOM IN ↑
 Die Spine Dichte von SOM IN ist in präsymptomatischen SOD Tieren reduziert (A). Zp2 bzw. auch die Ergebnisse der anderen, älteren Kohorten zeigen keinen Effekt (C, E). Der dynamische Parameter der Überlebensfraktion zeigte keine genotypabhängigen signifikanten Unterschiede (B, D, E). Datenpunkte entsprechen den einzelnen Dendriten. Es werden die entsprechenden Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes visualisiert. Die hier angegebenen Signifikanzniveaus sind Ergebnis des Sidak Post-Hoc Tests nach Anwendung der 2w rm ANOVA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; WT: Wildtyp, SOD: transgene Mauslinie, SOM IN: Somatostatin exprimierende Interneuronen, Zpx: Zeitpunkt x

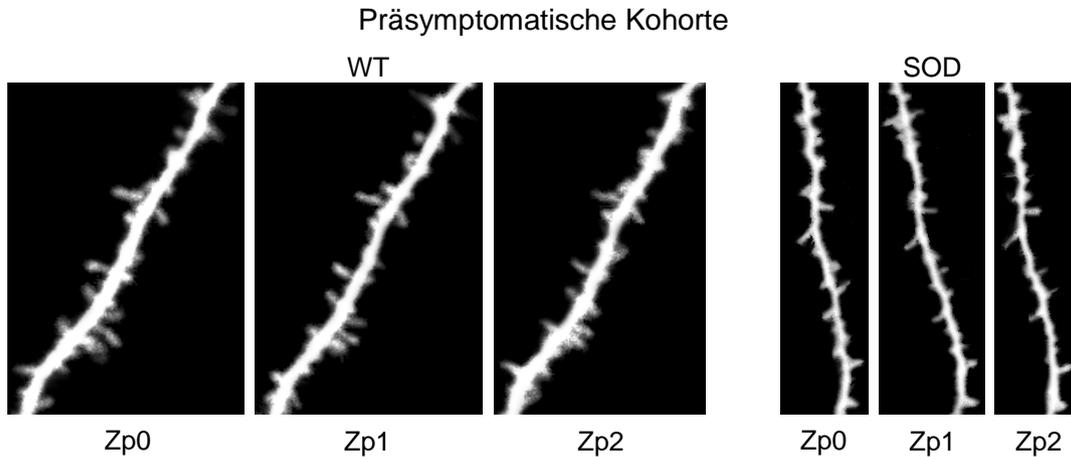


Abb. 21: Beispiel präsymptomatischer Dendriten
 Repräsentatives Beispiel für Spines auf einem Dendriten einer präsymptomatischen Wildtyp (WT) und transgenen Maus (SOD). Um die dreidimensionalen Zellfortsätze hier präsentieren zu können, wurden die Rohbildstapel anhand der Durchschnittsintensitäten in ein zweidimensionales Bild projiziert. Dies ist mit Qualitätsverlust verbunden. Aus illustratorischen Gründen wurden die Strukturen zusätzlich freigestellt. Zpx: Zeitpunkt x

Die Umsatzrate (engl. turnover rate, TOR) ergibt sich aus der gemittelten Formations- und Verlustrate der dendritischen Spines. Bei nicht signifikantem 2w rm ANOVA Test ist isoliert die TOR am Zp2 der fünf bis sechs Monate alten WT Kohorte signifikant kleiner als die der SOD transgenen Mäuse (2w rm ANOVA, Zeit $F(1,7) = 9,365$, $p = 0,0031$; Genotyp $F(1,7) = 1,111$, $p = 0,2955$; Interaktion $F(1,7) = 6,128$, $p = 0,0157$, Sidak: $p_{Zp2p} = 0,0461$, $n_{WT}(\text{Mäuse/ Dendriten}) = 7/33$, $n_{SOD}(\text{Mäuse/ Dendriten}) = 7/39$, siehe Abb. 23B und Tab. 9). Es zeigten weder die älteste Kohorte noch die jüngeren Tiere signifikante TOR Unterschiede (siehe Abb. 23A, C).

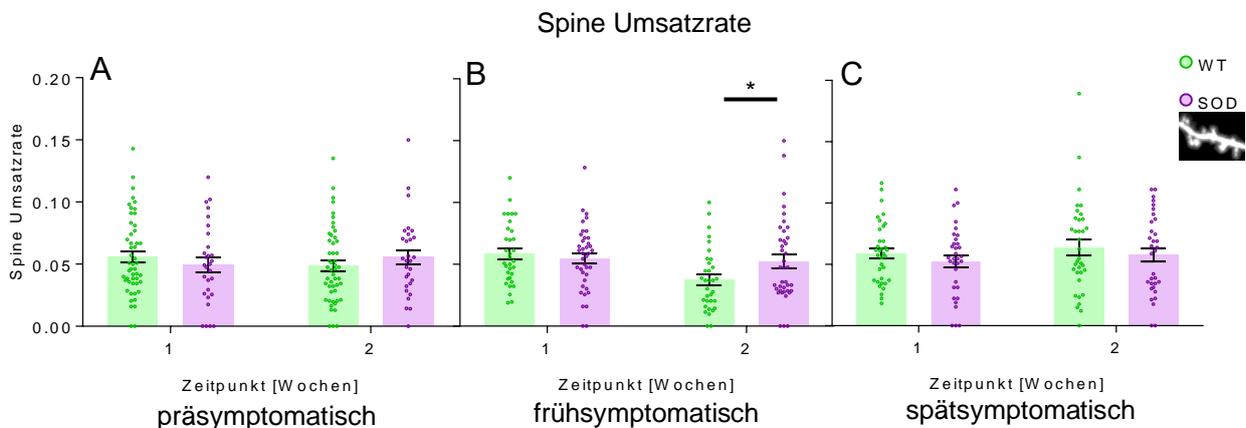


Abb. 23: Umsatzrate der dendritischen Spines von SOM IN ↑
 Am Zp2 der frühsymptomatischen Tiere (B) ist die Umsatzrate der Spines signifikant höher als bei der Kontrollgruppe. Allerdings zeigte sich in der 2w rm ANOVA kein Effekt zwischen den Genotypen. Ansonsten konnte kein Effekt im Parameter Umsatzrate gemessen werden (A, C).
 Datenpunkte entsprechen den einzelnen Dendriten. Es werden die entsprechenden Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes visualisiert. Die hier angegebenen Signifikanzniveaus sind Ergebnis des Sidak Post-Hoc Tests nach Anwendung der 2w rm ANOVA. * $p < 0.05$; WT: Wildtyp, SOD: transgene Mauslinie

Abgesehen von den Daten der Spine Dichte der präsymptomatischen SOD Tiere und der TOR der frühsymptomatischen Mäuse zeigten sich keine weiteren signifikanten Unterschiede in Dichte und Parametern der Dynamik zwischen WT und SOD (siehe Abb. 22).

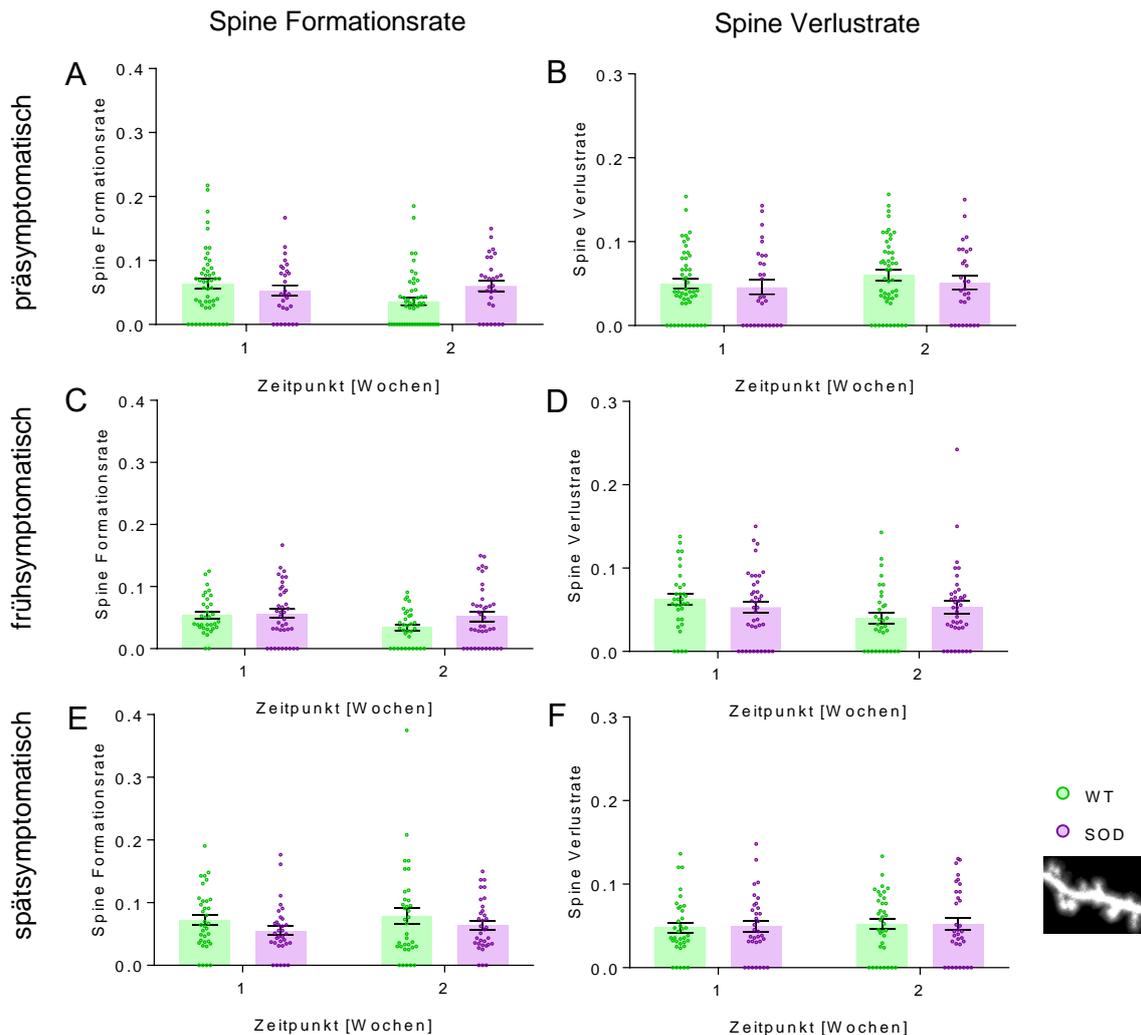


Abb. 22: Spine Formations- und Verlustrate bzw. Überlebensfraktion
 Die drei dynamischen Parameter Formations- (A, C, E), Verlustrate (B, D, F) und Überlebensfraktion (G, H, I) zeigen keine signifikanten Effekte (2w rm ANOVA + Sidak), weder in den präsymptomatischen (A, B, G), den frühsymptomatischen (C, D, H) noch in den spätsymptomatischen (E, F, I) Tieren.
 Datenpunkte entsprechen den einzelnen Dendriten. Darstellung als Mittelwerte +/- SEM. WT: Wildtyp, SOD: transgene Mauslinie

8.3.2 Boutons von SOM IN in SOD Tieren sind nicht verändert.

Zusätzlich zu postsynaptischen Korrelaten wurde auch die strukturelle Plastizität der präsynaptischen Boutons auf den Axonen der SOM IN ausgewertet. Somit können Daten über den Input der IN gesammelt werden. Die Boutons an den Axonen der SOM IN wiesen keine signifikanten Unterschiede in Korrelation mit der *SOD1^{G93A}* Mutation, weder in Dichte noch Dynamik, auf (siehe Tab. 8, Abb. 24 und Abb. 25).

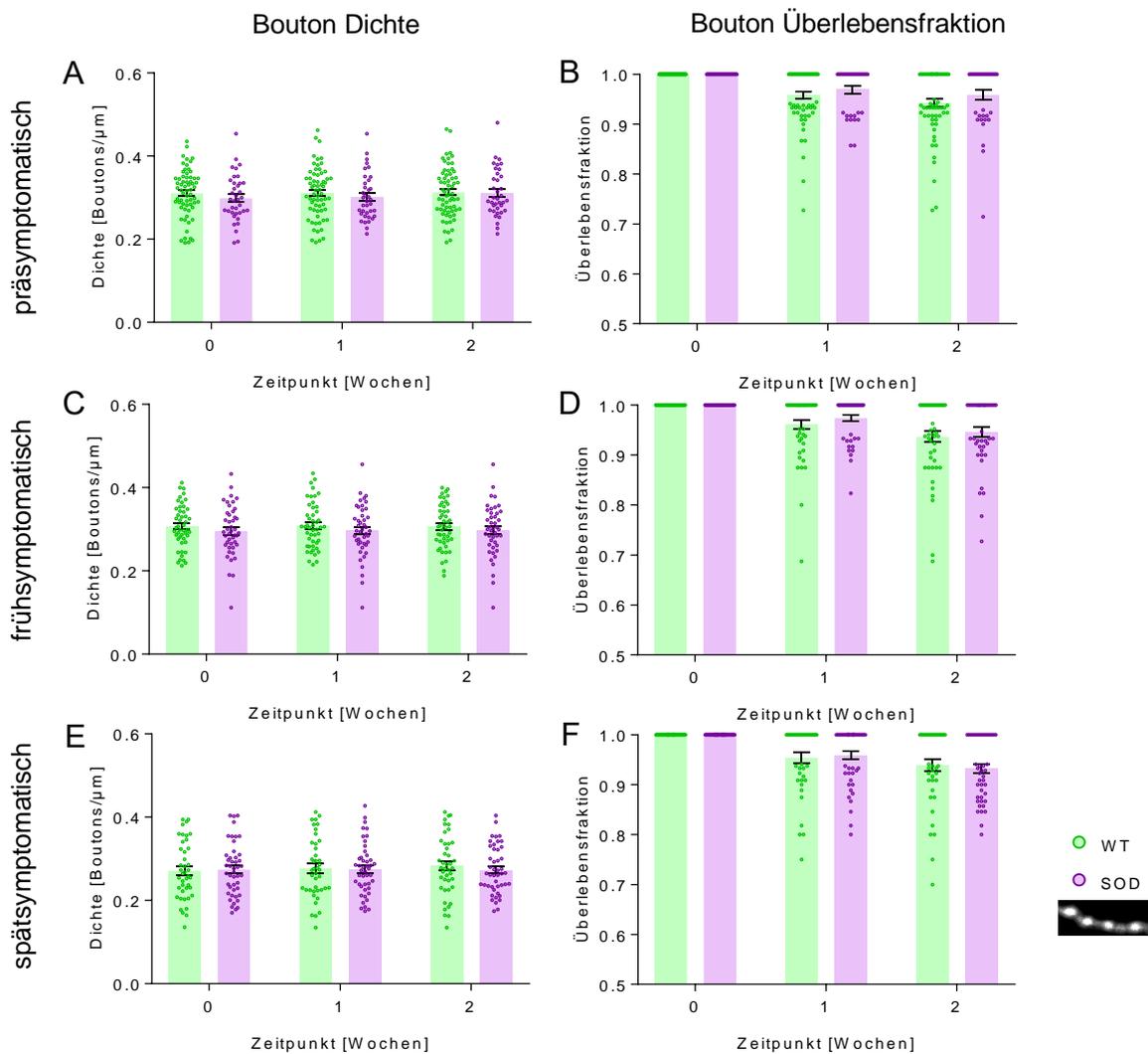


Abb. 24: Bouton Dichte und Überlebensfraktion

Beide Parameter, Dichte (A, C, E) und Umsatzrate (B, D, F), zeigen keine signifikanten Effekte (2w rm ANOVA + Sidak).

Datenpunkte entsprechen den einzelnen Axonen. Darstellung als Mittelwerte +/- SEM. WT: Wildtyp, SOD: transgene Mauslinie

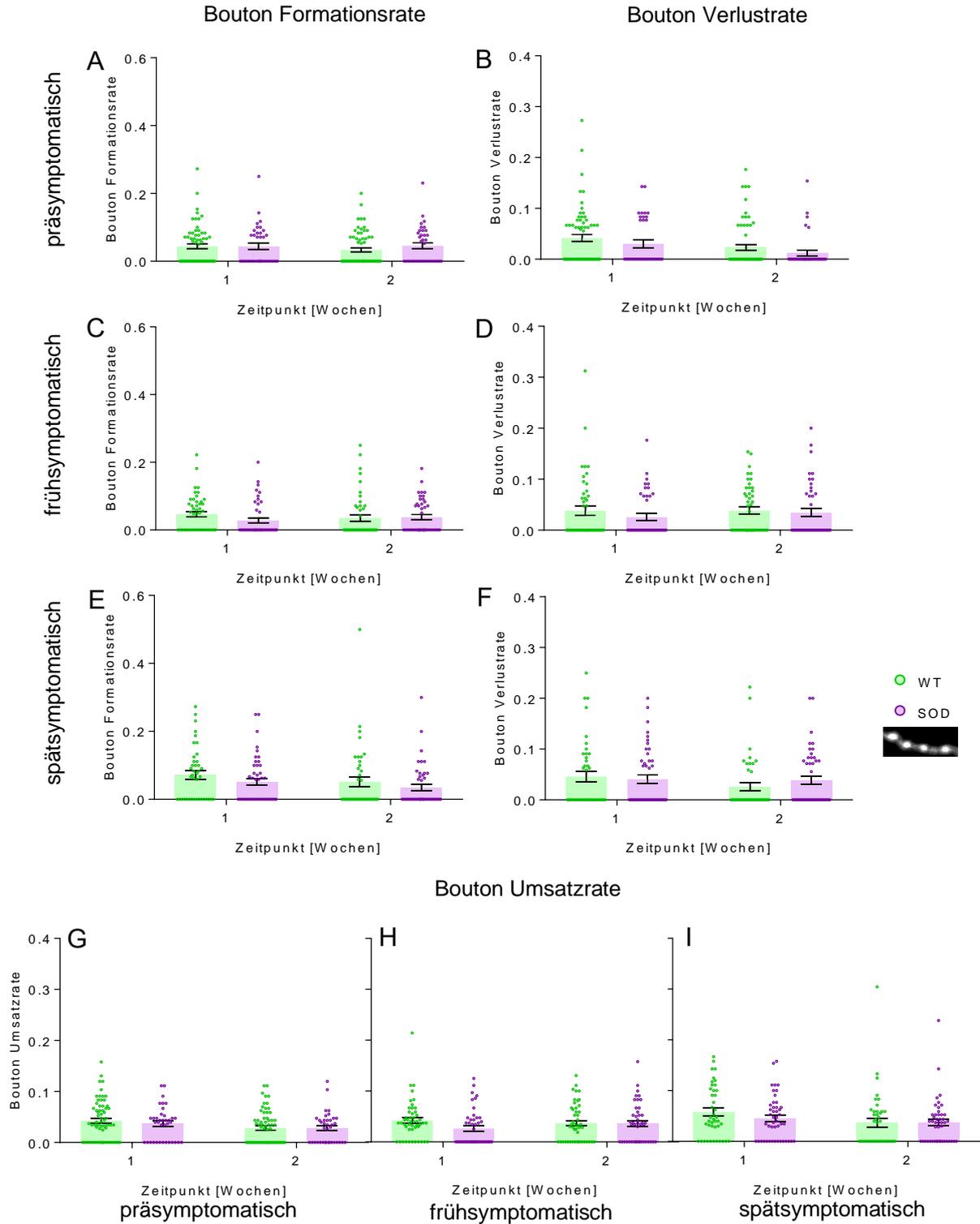


Abb. 25: Bouton Verlust-, Formations- und Umsatzrate
 Der Vergleich der drei erhobenen Parameter Verlust- (A, C, E), Formations- (B, D, F) und Umsatzrate (G, H, I) verdeutlichte keine signifikanten Effekte (2w rm ANOVA + Sidak).
 Datenpunkte entsprechen den einzelnen Axonen. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM. WT: Wildtyp, SOD: transgene Mauslinie

9 Diskussion

ALS ist eine neurodegenerative Erkrankung der oberen und unteren Motoneuronen. Die Pathogenese der Motorneurondegeneration ist unzureichend verstanden und es existiert derzeit keine kausale Therapie mit Heilungsperspektive, sondern nur ein symptomatisches, palliatives Prozedere. Kortikale Übererregbarkeit ist ein frühes Phänomen, welches wahrscheinlich die Degeneration von spinalen Motorneuronen mitbedingt. Die zellautonomen und Netzwerkursachen, welcher kortikaler Übererregbarkeit zugrunde liegen, sind bisher nicht entschlüsselt. Neue wissenschaftliche Erkenntnisse weisen auch auf eine Rolle von hemmenden Interneuronen in der Entstehung der kortikalen Übererregbarkeit bei ALS hin.

In dieser Dissertation wurde daher die strukturelle Plastizität der SOM IN *in vivo* untersucht, um Rückschlüsse auf ihre funktionellen Eigenschaften im Rahmen der Pathogenese der ALS tätigen zu können. Zusätzlich sollen die Daten aus den klinischen und histologischen Versuchen der weiteren Spezifikation der Mauslinie dienen [Acevedo-Aroza et al., 2011, Alexander et al., 2004].

9.1 $SOD1^{G93A}$ (low copy) transgene Tiere phänotypisieren ALS Symptome

Zunächst wurde die genutzte transgene Mauslinie, $SOD1^{G93A}$ mit einer niedrigen Kopienanzahl des mutierten SOD Gens im Vergleich zum Standard SOD Modell, hinsichtlich ihres Symptombeginns und dessen Ausprägung charakterisiert. Hierfür wurde ein Scoring System als auch ein Test zur Erfassung der muskulären Kraft bzw. Ausdauer genutzt.

Die $SOD1^{G93A}$ Mauslinie [Gurney et al., 1994, JacksonLaboratory] ist die am weitesten verbreitete Mauslinie zur Untersuchung der Pathomechanismen der ALS. Hier wurden Mäuse mit einer kleinen Mutationslast gewählt, damit das Einsetzen der Symptome und die Progression der neurodegenerativen Erkrankung verlangsamt ist [Acevedo-Aroza et al., 2011, Alexander et al., 2004, JacksonLaboratory]. Damit verbunden ist eine höhere Wahrscheinlichkeit zeitlich begrenzte Effekte mit einer chronischen Versuchsreihe messen zu können. Acevedo-Aroza et al. konnten zeigen, dass der genetische Hintergrund der Versuchstiere die ALS Progression stark beeinflusst [Acevedo-Aroza et al., 2011]. Statt mit drei bis vier Monaten schon Symptome zu zeigen, welche mit fünf Monaten tödlich enden, setzt die ALS erst mit sechs Monaten ein und endet fatal mit etwa neun Monaten [Acevedo-Aroza et al., 2011, Alexander et al., 2004, Gurney et al., 1994, JacksonLaboratory]. Aufgrund dieses Krankheitsverlaufs wurden auch die Alterskohorten ausgewählt: Die jüngste als Baseline und je eine frühsymptomatische und eine spätsymptomatische Gruppe.

Ich nutzte den Gitter-Häng-Test zur Erfassung der Kraftausdauer der Tiere. Dieser Test ist leicht zu erlernen und sehr effizient in Hinsicht auf Equipment, finanziellem Aufwand, Zeit und Training der Versuchstiere. Allerdings ist dieser nichtinvasive Versuchsaufbau stark abhängig vom Alter, Geschlecht und Gewicht der Versuchstiere. Die Motivation, sich mit aller Kraft mit Hilfe der vier Extremitäten so lange wie möglich am Gitter festzuhalten, entsteht aus der instinktiven Angst vor dem Fall. Nach wiederholter

Durchführung kann die Maus sich jedoch an das Umfeld gewöhnt haben und sich an die weiche Landung erinnern, wodurch die innere Triebkraft sich verringert. Den gewählten Maximalwert muss man bei der Auswertung berücksichtigen. So ist es möglich, dass v.a. die jungen und gesunden Versuchstiere keine normalverteilten Datenreihen produzieren. Da ALS mit fataler Muskelschwäche einhergeht, ist ein Cut-off-Wert von 5 Minuten ausreichend, solange man keine Unterschiede bei den jüngeren, asymptomatischen Tieren untersuchen möchte. Dieser Test ist ungeeignet zur Untersuchung von Koordination und Balance. Auch erfasst dieser Test nicht, wann die Maus einen Erschöpfungstremor ausbildet, wie lange alle vier Extremitäten inkl. Schwanz sich am Gitter festklammern bzw. wann der Schwanz oder die Hinterbeine den Kontakt verlieren. Zur Elimination der Moderatorvariable Gewicht wurde zusätzlich zur Zeit auch der Impuls der Mäuse verglichen. Anschließend wurden die Geschlechter getrennt betrachtet. Die Vergleiche aus den Impulswerten weisen signifikantere Unterschiede auf als die bloße Zeit. So scheint es möglich zu sein, die meist schlankeren weiblichen Mäusen mit den Männchen zu vergleichen. [Bellantuono et al., 2020]

Der hier gemessene Griffkraftverfall im Alter von sieben Monaten (siehe 8.1.2) deckt sich mit den Ergebnissen von Acevedo-Arozena et al. [Acevedo-Arozena et al., 2011]. Das mittlere Überleben der Tiere scheint mit den Angaben der Jackson Laboratory von neun bis zehn Monaten übereinzustimmen [Acevedo-Arozena et al., 2011, JacksonLaboratory]. Zusätzlich konnten mit den Daten aus dem Gitter-Häng-Test und des SOD Scores weitere Indizien gesammelt werden [Acevedo-Arozena et al., 2011], dass die artifizielle ALS der Mauslinie auch eine stärkere Ausprägung der Klinik bei männlichen Tieren aufweist, wie auch bei Menschen [Fang et al., 2015]. Auch in der Mauslinie mit erhöhter Genlast $SOD1^{G93A}$ sind männliche Mäuse früher symptomatisch als weibliche [Alves et al., 2011]. Die genaue Ausprägung dieser Tendenz ist mit den vorliegenden Daten infolge der zu kleinen Grundgesamtheit bzw. der großen Variabilität der Messwerte im Gitter-Häng-Test aufgrund der oben aufgeführten Faktoren nicht bestimmbar.

Meine Befunde stimmen mit den Ergebnissen von Alexander et al. und Acevedo-Arozena et al. überein [Acevedo-Arozena et al., 2011, Alexander et al., 2004] und decken sich auch mit den Angaben der Züchter [JacksonLaboratory]. Man kann festhalten, dass männliche SOD Tiere mit 4 Monaten ein muskuläres Defizit aufweisen, während SOD Weibchen erst mit 7 Monaten Hinweise auf einen Kräfteverfall zeigen.

9.2 SOM und PV IN weisen ALS-assoziiert keine Dichteänderung auf

Immunhistochemisch fand ich eine altersabhängige Reduktion der SOM IN Dichte in WT, jedoch nur in L2/3 des M1 in transgenen Mäusen. Dieser Effekt wurde auch von Schmid et al. in der gleichen GIN Mauslinie in Verbindung mit einer anderen neurodegenerativen Erkrankung, Alzheimer Krankheit, gemessen [Schmid et al., 2016]. Zudem kann man aus den hier präsentierten Ergebnissen ableiten, dass in M1 kein ALS abhängiger Untergang der IN besteht.

In S1 konnten auch CSMN nachgewiesen werden; ihre Axone ziehen zum dorsalen Horn im Rückenmark, während M1 CSMN ins ventrale Horn projizieren [Lemon, 2008, Macías et al., 2022, Suter et al., 2015, Ueno et al., 2018]. Den CSMN in S1 wird eine prädiktive Steuerung und ein Filtermechanismus für antizipierte Sinneseindrücke zugeschrieben, die durch Bewegung erzeugt werden [Ueno et al., 2018]. Ihre Ablation in einem Mausmodell führte zu unsauberer Greifmotorik mit falsch berechnetem Timing, Abläufen und fehlerhaften Positionen der Pfote [Ueno et al., 2018].

In dem hier präsentierten Experiment konnte keine signifikant veränderte SOM IN Dichte gemessen werden; nur in L2/3 von S1 kann vorsichtig von einem Trend zu einer Dichteminderung der SOM IN gesprochen werden. Fogarty et al. beobachteten eine erhöhte Rate an erregenden postsynaptischen Strömen (EPSC) der CSMN im präsymptomatischen Alter in *SOD1^{G93A}* transgenen Tieren [Fogarty et al., 2015]. Theoretisch könnte durch eine erniedrigte Dichte an IN ein inhibitorisches Defizit auf die CSMN entstehen. Da in M1 jedoch keine Unterschiede messbar waren, kann dieser Ansatz die kortikale Übererregbarkeit nicht vollständig erklären. Die Ergebnisse von Clark et al. zeigten ebenfalls, dass sich sowohl in M1 als auch in S1 die SOM IN Dichte ALS assoziiert nicht verändert [Clark et al., 2017].

Die wissenschaftliche Datenlage bzgl. PV IN Dichten während der Pathogenese der ALS ist sehr variabel: Patienten mit ALS zeigten posthum eine verringerte PV IN Dichte [Nihei et al., 1993]; in einer neueren Studie war jedoch kein Unterschied messbar, nur ein nicht signifikanter Trend in L6 [Maekawa et al., 2004]. Auch in den hier verwendeten *SOD1^{G93A}* Mäusen erbrachten verschiedene Studien unterschiedliche Ergebnisse: Während Özdinler et al. und Clark et al. keinen PV IN Dichteunterschied messen konnten [Clark et al., 2017, Özdinler et al., 2011], berichteten Minciacchi et al. von erhöhter PV IN Dichte [Minciacchi et al., 2009]. Das Wobbler Mausmodell [Nieto-Gonzalez et al., 2011], ein weiteres ALS assoziiertes Mausmodell, weist eine verringerte PV IN Dichte auf. Scekcic-Zahirovic et al. berichten von gleicher PV IN Dichte in *FUS^{ΔNLS}* transgenen Mäusen [Scekcic-Zahirovic et al., 2021]. Es zeichnet sich ein unstimmgiges Bild in Bezug auf die PV IN Dichte während der Pathogenese der ALS. Unsere Ergebnisse ohne Nachweis einer ALS abhängigen PV IN Dichteänderung reihen sich mit den Studien von Özdinler et al., Clark et al. und Maekawa et al., Scekcic-Zahirovic et al. ein [Clark et al., 2017, Maekawa et al., 2004, Özdinler et al., 2011, Scekcic-Zahirovic et al., 2021].

Die Interaktionen der kortikalen Neuronen sind komplex [Brunet et al., 2020, Tremblay et al., 2016]. So projizieren PV IN perisomatisch auf CSMN, SOM IN jedoch sowohl auf PV IN als auch CSMN. Interessanterweise scheinen IN im Gegensatz zu CSMN und Gliazellen keine intrazellulären Proteinaggregate auszubilden [Nolan et al., 2020]. Zhang et al. konnten Hinweise auf hyperaktive SOM IN in *TDP-43* Mäusen sammeln [Zhang et al., 2016], was entweder eine direkte Hemmung der CSMN oder aber eine Enthemmung der CSMN via Reduktion der inhibitorischen Signale der PV IN auf CSMN zur Folge haben könnte.

Um weitere Informationen bzgl. der Struktur und indirekt der Funktion der SOM IN zu sammeln, wurden neben der Somadichte noch die synaptischen Korrelate mit einem 2P Mikroskop untersucht.

9.3 Spines und Boutons: Die Synapsen der SOM IN in der ALS

Die postsynaptischen Strukturen unterliegen abhängig vom Alterungsprozess einem ständigen Wandel: Postnatal ist der Umsatz der Spines am größten [Lendvai et al., 2000] und sinkt dann im Verlauf des Lebens ab [Grutzendler et al., 2002, Hofer et al., 2009, Zuo et al., 2005a, Zuo et al., 2005b]. Auch im adulten Kortex konnte strukturelle Plastizität nachgewiesen werden. Etwa die Hälfte der Strukturen scheinen für mindestens einen Monat stabil zu bleiben, andere jedoch nur wenige Tage wieder auffindbar zu sein [Trachtenberg et al., 2002]. Ob dies bei dendritischen Spines von IN ebenfalls der Fall ist, ist bisher unzureichend verstanden.

Durch neue Erfahrungen und gelernte Fähigkeiten erhöht sich der Umsatz der Spines in den jeweiligen Hirnarealen [Fu et al., 2012, Hofer et al., 2009, Holtmaat et al., 2005, Zuo et al., 2005b]. Die Leistung in den motorischen Aufgaben korreliert mit der Anzahl der neu geformten Spines [Xu et al., 2009]. Auch andere Teams konnten eine erfahrungsabhängige Plastizität mit Auswirkungen auf Umsatz der Spines, Destabilisierung existierender und Formation neuer Spines beobachten [Caroni et al., 2012, Chidambaram et al., 2019]. Fu et al. konnten zeigen [Fu et al., 2012], dass infolge von repetitivem Training neue Spines in sog. Clustern angelegt werden: Diese geclusterten Gruppen hatten größere Köpfchen und blieben auch nach Ende der Trainingsphase bestehen. Die spezifische Position der Synapsen entlang des Dendriten scheint ausschlaggebend zu sein.

In weiteren Experimenten wurden Neuronen stimuliert: Langzeit Potenzierung (LTP) beschreibt eine hohe Frequenz an Stimuli und Langzeit Depression (LTD) Stimuli mit niedriger Frequenz. LTP hat zur Folge, dass Spineköpfchen anschwellen und mehr AMPA Kanäle exprimieren, dünne Spines zu pilzförmigen konvertieren, die Stabilisierung neuer Spines und eine Spinedichteerhöhung [Kopec et al., 2006, Matsuzaki et al., 2004, Nägerl et al., 2004]. Die Wirkung von LTD ist antagonistisch: LTD führt zu geschrumpften Spineköpfchen, verringerte Anzahl an Spines, Verlust bestehender Spines und damit eine geringere Spinedichte [Bastrikova et al., 2008, Nägerl et al., 2004, Zhou et al., 2004]. Das Nutzungsverhalten der Synapsen ist also ein eminenter Faktor in der Plastizität der Zellfortsätze und den darauf befindlichen Korrelaten.

Der Großteil des aktuellen Wissens bezüglich der Form und Dynamik von dendritischen Spines wurde an exzitatorischen Pyramidalzellen im Kortex erhoben [Caroni et al., 2012, Chidambaram et al., 2019, Fu et al., 2012, Hofer et al., 2009, Holtmaat et al., 2005, Kopec et al., 2006, Lendvai et al., 2000, Trachtenberg et al., 2002, Xu et al., 2009, Zuo et al., 2005b]. IN besitzen überwiegend keine dendritischen Spines, mit einigen Ausnahmen, so auch SOM IN [Freund et al., 1996, Guirado et al., 2014, Oliva et al., 2000]. Im *thy-1-GFP* transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IN nicht nur struktureller Plastizität unterliegen, sondern, dass synaptische

Kontakte anhand von Erfahrungen und Nutzungsfrequenz entstehen und verringert werden [Chen et al., 2011a, Chen et al., 2011b, Keck et al., 2011, Lee et al., 2008, Lee et al., 2006]. Neben visueller Deprivation konnte auch chronischer Stress als Korrelat zu Spinedynamiken verifiziert werden [Chen et al., 2011b, Gilabert-Juan et al., 2011, Gilabert-Juan et al., 2012, Keck et al., 2011, Lee et al., 2006].

Um synaptische Strukturen von SOM IN zu untersuchen nutzten wir die GIN (engl. GFP expressing Inhibitory Neurons) Mauslinie von Oliva et al. [JacksonLaboratory, Oliva et al., 2000] in welcher in GABAergen IN GFP ko-exprimiert wird.

Die hier gezeigte SOD abhängige verringerte Spinedichte von SOM IN im präsymptomatischen Alter könnte ein Hinweis auf einen verringerten Input auf die SOM IN sein. Beim Einsetzen der Symptome kann jedoch kein signifikanter Unterschied in den hier gemessenen Parametern erhoben werden. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf präsymptomatische kortikale Vorgänge im Rahmen der Pathogenese der ALS. Es könnte jedoch auch mit der bekannten altersabhängigen Veränderung der Spinedichte in Wildtieren zusammenhängen [Chen et al., 2011a, Schmid et al., 2016]. In den hier präsentierten Experimenten konnte kein signifikanter Unterschied bzgl. der präsynaptischen Korrelate zwischen transgenen und Wildtyp Mäusen gemessen werden. Weder die statischen noch die dynamischen Parameter zeigten Änderungen des intrakortikalen neuronalen Netzwerkes. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass trotz veränderten eingegangenen Signalmustern sich das Aktivitätsverhalten der SOM IN nicht ändert.

Spines und Boutons haben kein strenges 1:1 Verhältnis. So können mehrere Dendriten einen Bouton kontaktieren und mit ihm eine Synapse bilden [Fu et al., 2012]. Diese multiplen Synapsen könnten aufgrund von sehr hoher Signaldichte ausgelöst werden. Fu et al. konnten dies an exzitatorischen Synapsen zeigen, an inhibitorischen IN wurde dieses Phänomen noch nicht ausreichend untersucht. Trotzdem, die rein strukturelle Morphologie einer Zelle ist kein direkter Nachweis einer Synapsenbildung. Manche Spines bilden keine Synapsen aus [Genç et al., 2017]. Auch sind Methoden wie immunhistologische Färbungen oder 2P Mikroskopie mit Ca^{2+} abhängige Fluorophoren ein direkterer Nachweis einer neuronalen Aktivität im Vergleich zur rein strukturellen Bildgebung [Chidambaram et al., 2019].

Im Vergleich zu den IN sind CSMN strukturell viel umfassender untersucht worden: Während der Pathogenese der ALS wird der apikale Dendritenbaum kleiner und zusätzlich die Spinedichte verringert, sowohl im *SOD1^{G93A}* Mausmodell [Fogarty et al., 2016b, Fogarty et al., 2015, Jara et al., 2012, Spalloni et al., 2011] als auch in posthumer humanen histologischen Gehirnpräparaten [Genç et al., 2017, Hammer et al., 1979, Udaka et al., 1986]. Das basale Dendritennetzwerk scheint dafür zu kompensieren [Saba et al., 2016]. Marcuzzo et al. berichten über eine gesteigerte Spinedichte in CSMN Kulturen von *SOD1^{G93A}* Mäusen *ex vivo* [Marcuzzo et al., 2019]. SOM IN bilden sowohl mit den apikalen als auch mit den basalen Dendriten der CSMN Synapsen aus (siehe 4.1.3.8) [Brunet et al., 2020, Tremblay et al., 2016]. Die wissenschaftlichen Erkenntnisse bzgl. der Makrostruktur der IN während der ALS sind begrenzt: Clark et al. konnten zeigen, dass IN eine erhöhte Komplexität mit längeren

und mehr Zellfortsätzen ausbilden [Clark et al., 2018]. Eine andere Studie zeigte jedoch, dass inhibitorische Boutons ALS assoziiert eine geringere Dichte aufweisen, aber die überlebenden Boutons eine vergrößerte aktive Zone aufweisen [Sunico et al., 2011]. In den SOM IN scheint dies jedoch nicht der Fall zu sein. Sie bilden nur etwa 30% der kortikalen IN [Tremblay et al., 2016], somit wäre es denkbar, dass andere IN für die Ergebnisse von Sunico et al. verantwortlich sind. Außerdem scheint die Gruppe der SOM IN eine sehr heterogene Gruppe an Neuronen mit unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften, Morphologie und Funktionen im neuronalen Netzwerk zu sein [Oliva et al., 2000, Riedemann et al., 2015, Riedemann et al., 2018, Wu et al., 2023]. Um fundierte Erkenntnisse bezüglich der kortikalen Netzwerke und ihrer Veränderungen während einer ALS Erkrankung zu generieren, wäre eine genauere IN Klassifikation und Methodik zur Gewinnung von *in vivo* Daten der SOM IN Untergruppen hilfreich.

Aktuell sieht es jedoch so aus, als würden die untersuchten SOM IN nicht an oben genannten Veränderungen der CSMN durch eine *SOD1^{G93A}* Mutation beteiligt sein. Zwar zeigen sich Hinweise für einen isolierten erniedrigten Input präsymptomatisch, jedoch keine Indizien für einen veränderten Output. Bei erniedrigter Spinedichte der CSMN würde man an den IN eine ebenfalls erniedrigte Boutondichte erwarten. Daten zur prä- und postsynaptischen Aktivität der SOM IN könnten hier weitere Erkenntnisse hervorbringen.

9.4 Generalisierbarkeit der Ergebnisse

Die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierversuchen auf Diagnostik und Therapie von menschlichen Patienten ist auch heute noch ein kontrovers diskutiertes Thema. Im Folgenden sollen moralische, ethische und Gründe aus dem Tierschutzsektor ausdrücklich nicht behandelt werden.

Mäuse weisen verglichen mit dem menschlichen NS zum Teil gravierende Unterschiede auf: Das humane ZNS weist teilweise monosynaptische neuronale Kontakte zwischen CSMN und zervikalen SMN auf, Mäuse hingegen ausschließlich indirekte, mindestens disynaptische, neuronale Kontakte via spinaler IN oder Stammhirnbahnen [Alstermark et al., 2004, Lemon, 2008]. Alstermark et al. argumentieren, dass so der Mensch zur Feinmotorik der Hände bzw. zum Steuern der Finger unabhängig voneinander fähig ist [Alstermark et al., 2004]. Des Weiteren konnten Riedemann et al. [Riedemann et al., 2015] zeigen, dass im Maus Fasskortex SOM IN mit einer Koexpression von SOM und dem Ca^{2+} bindenden Protein Calretinin existieren. Diese Konstellation kommt im menschlichen Gehirn nicht vor [González-Albo et al., 2001]. Nichtmenschliche Primaten sind laut Uchida et al. ein besseres Tiermodell zur Untersuchung der Pathophysiologie und -genese der ALS [Uchida et al., 2012]. Zudem basiert das ALS Tiermodell nur auf einer genetischen Mutation im Gen der SOD; beim Menschen jedoch zeigt sich meist eine sehr heterogene und multifaktorielle Genese (siehe 4.1.3). Es stellt sich die Frage, wie akkurat das Mausmodell die ALS beim Menschen nachbilden kann. Baker postuliert, dass v.a. die sALS eine Erkrankung der Menschen ist und bei Nagetieren und anderen Säugetieren, abgesehen von nichtmenschlichen Primaten, unter anderem aufgrund der physiologischen Unterschiede im ZNS nicht vorkommt [Baker, 2014, Uchida et al.,

2012]. Die uns verfügbaren Mausmodelle basieren auf fALS, welche in nur 10% der ALS Patienten vertreten ist [Brown et al., 2017, Fang et al., 2015, Renton et al., 2014].

Das *SOD1* Mausmodell ist eine der ältesten ALS assoziierten Mauslinien [Gurney et al., 1994, Philips et al., 2015]. Es repliziert die intrazelluläre Aggregatbildung mutierter *SOD1* Proteine in MN und Gliazellen [Bruijn et al., 1997], außerdem verringerte Expression von Glutamat Transportproteine in Astrozyten [Bendotti et al., 2001]. Die humane ALS konnte allerdings nur in etwa 2,5% der Fälle mit einer *SOD1* Mutation in Verbindung gebracht werden [Zou et al., 2017]. Ein zentrales Symptom der humanen ALS ist der CSMN Untergang, der im *SOD1* Mausmodell nicht beobachtet werden konnte [Özdinler et al., 2011]. Zudem konnten Substanzen mit vielversprechenden Ergebnissen im präklinischen Setting ihre Wirkung im klinischen Bereich nicht replizieren [Cudkowicz et al., 2006, Gordon et al., 2007, Philips et al., 2011, Vieira et al., 2014, Zhu et al., 2002]. Die ALS scheint in den Tiermodellen nicht vollkommen nachgebildet zu werden.

Somit zeigt sich, dass bisher nur eine bedingte Generalisierbarkeit der Ergebnisse aus Versuchen an Nagetieren unter Laborbedingungen auf Patienten zu gewährleisten ist.

10 Beiträge weiterer Wissenschaftler

Alle hier präsentierten Experimente und Analysen wurden durch den Autor persönlich durchgeführt, abgesehen von folgenden Ausnahmen: Vanessa W.Y. Kan übernahm das Einbetten der Hirnpräparate in Vectashield, das Anfertigen der Gewebeschnitte, den immunhistochemischen Färbeprozess inkl. der Fluorogold Injektion und außerdem die Aufnahme und Digitalisierung der Konfokalaufnahmen. Prof. Sabine Liebscher etablierte die Verblindung des Autors und stellte den MathLab basierten Auswertalgorithmus der 2P Mikroskopie Daten zur Verfügung.

Im Rahmen der strukturierten Promotion via LMU betreuten neben Prof. Sabine Liebscher (Institut für Klinische Neuroimmunologie, LMU) als primäre Aufsichtsperson auch Prof. Florence Bayrere (Institut für Klinische Neuroimmunologie, LMU) und Prof. Nikolaus Plesnila (Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung, LMU) die Planung, Durchführung, Auswertung der Experimente und Anfertigung der Thesis.

Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der Monografie wurden die hier präsentierten Versuche nicht anderweitig publiziert.

11 Danksagung

In diesem Abschnitt möchte ich allen Personen danken, die mich an der Fertigstellung des Projekts und der Doktorarbeit tatkräftig unterstützt haben. Meiner Betreuerin Prof. Sabine Liebscher möchte ich zunächst für die Chance unter ihrer Aufsicht wissenschaftliche Forschung zu erleben und gleichzeitig für Ihr immenses Vertrauen danken. Ohne Dich wäre das Vorhaben nicht möglich gewesen. Vielen, vielen herzlichen Dank für alle die unzähligen Ratschläge, Organisation, Lehre, Motivation und vor allem Geduld, die du mir in den vergangenen Jahren entgegengebracht hast. Vielen Dank für die unzähligen E-Mails, Nachrichten und auch persönliche Hilfe zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Außerdem darf ich die Mitglieder der AG Liebscher, Vanessa Y.W. Kan, Siyuan Li, Zeynep I. Gunes, XiaoQian Ye, Pavel Svehla, Christopher Douthwaite, erwähnen, die mich unterstützten und jeweils Teile meines Trainings übernahmen. Nicht nur im professionellen akademischen Rahmen habe ich euch viel zu verdanken, sondern auch nach bzw. zwischen den Versuchen habt ihr mich herzlich aufgenommen und mich über die von COVID 19 geprägte Zeit hinweg motiviert und angetrieben. Vielen Dank an das Institut für klinische Neuroimmunologie für die professionelle, tatkräftige Unterstützung und Lehre. Bedanken möchte ich mich bei meinen beiden Ko-Betreuern Prof. Florence Bayrere und Prof. Nikolaus Plesnila für ihre Korrekturen und Hilfe.

Im privaten Rahmen möchte ich meiner Familie für ihre Geduld danken. Auch meinen Freunden, dass sie mich während des Projekts und des Studiums motiviert und unterstützt haben. Lisa M. Schmidhuber, vielen herzlichen Dank, dass du mir das Fertigstellen des Manuskripts während meiner Vollzeitstelle als Assistenzarzt ermöglicht hast.

Ich schätze mich sehr glücklich, dass ihr mir eure Zeit zur Verfügung gestellt habt und ich euch alle hier erwähnen darf. Vielen herzlichen Dank für Eure Unterstützung.

12 Abkürzungsverzeichnis

- 2P Mikroskopie Zweiphotonenmikroskopie
- 2w ANOVA engl. two way ANOVA
- 2w rm ANOVA engl. two way repeated measurements ANOVA
- ALS Amyotrophe Lateralsklerose
- AMPA α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionsäure
- ANOVA engl. Analysis of variance
- AP Aktionspotential
- ATP Adenosintriphosphat
- BMI Body-Mass-Index
- C9-ALS-FTD *C9orf72* assoziierte Erkrankung an ALS und FTD
- *C9orf72* engl. Chromosome 9 open reading frame 72
- Ca^{2+} Kalziumion
- CAM Core Facility Animal Models; Tierhaltung
- CCKZ Cholecystokinin exprimierende Korbzelle
- CI Konfidenzintervall
- Cl^- Chloridion
- CSMN Oberes bzw. erstes Motoneuron; engl. corticospinal MN
- DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol
- DNA Desoxyribonucleinsäure
- DPR Dipeptide repeats
- DREADD engl. designer receptors exclusively activated by designer drugs
- EAAT engl. Excitatory amino acid transporter
- eGFP engl. Enhanced green fluorescent protein
- EPSC engl. excitatory postsynaptic current
- ER Endoplasmatisches Retikulum
- ERAD ER associated degradation
- fALS familiäre Amyotrophe Lateralsklerose
- FG Hydroxystilbamidin, Fluorogold
- Fisher's LSD engl. Fisher's least significant difference
- FOV engl. Field of view
- FTD Frontotemporale Demenz
- *FUS* Fused in sarcoma
- GABA γ -Aminobuttersäure
- GAD67 Glutamat Decarboxylase GAD67
- GFP green fluorescent protein
- GIN engl. GFP expressing Inhibitory Neurons; Mauslinie
- GLT Glutamat Transporter
- GTP Guanosintriphosphat
- HIV Humanes Immundefizienz-Virus
- hM3D humaner muskarinerges Rezeptor 3D
- i.p. intraperitoneal
- IN Interneuron

- K⁺ Kaliumion
- LTD Langzeit Depression
- LTP Langzeit Potenzierung
- Lx engl. Layer x; isokortikale Schicht x
- M männlich
- M1 primär motorischer Kortex
- mAb monoklonalen Antikörper
- mGluR metabotroper Glutamatrezeptor
- MMF Medetomidin, Midazolam und Fentanyl
- MN Motoneuron
- mRNA engl. Messenger RNA
- Na⁺ Natriumion
- NGFZ neurogliaforme Zelle
- NMDA N-Methyl-D-Aspartat
- PBS Phosphatgepufferte Salzlösung
- PFA Paraformaldehyd
- PMT engl. photomultiplier tube
- PV Parvalbumin
- PZ Pyramidenzelle
- RAN repeat associated non-AUG translation
- RNA Ribonukleinsäure
- ROUT engl. Robust regression and outlier removal
- S1 primär sensorischer Kortex
- sALS sporadische Amyotrophe Lateralsklerose
- SEM engl. Standard error of the mean
- SICI engl. short-interval intracortical inhibition
- SMN Unteres bzw. zweites Motoneuron; engl. spinal MN
- SOD Superoxiddismutase transgene Mäuse
- *SOD1* Superoxiddismutase 1
- SOM Somatostatin
- *TARDBP* TAR DNA bindendes Protein
- TMS transkranielle magnetische Stimulation
- TOR Umsatzrate bzw. engl. Turnoverrate
- USA United States of America
- VGLUT vesikulärer Glutamat Transporter
- VIP vasointestinales Peptid
- W weiblich
- WT Wildtyp
- ZNS Zentrales Nervensystem
- Zp x Zeitpunkt x in Wochen; Zp0 entspricht der Operation

13 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: MN im ZNS	8
Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der ALS-assoziierten genetischen Mutationen in Europa [Zou et al., 2017]	15
Abb. 3: Glutamatwiederaufnahme an der Synapse	17
Abb. 4: kortikales Netzwerk in M1	22
Abb. 5: Netzwerkverschaltungen der IN	24
Abb. 6: Jablonski Diagramm	27
Abb. 7: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops	28
Abb. 8: Zeitstrahl Versuchsdesign	36
Abb. 9: Implantation des kraniellen Fensters	37
Abb. 10: In vivo Zweiphotonenmikroskopie	38
Abb. 11: Auswertekriterien	39
Abb. 12: Beispiel für das chronische Monitoring von axonalen Boutons und dendritischen Spines	40
Abb. 13: Immunhistochemische Aufnahmen des Mausekortex	43
Abb. 14: Vergrößerung der konfokalen Aufnahme IN spezifischer Immunfärbungen ↓	43
Abb. 15: Altersabhängiger Verlauf des SOD Score	45
Abb. 16: Muskuläre Kraft ist reduziert in symptomatischen SOD Mäusen	46
Abb. 17: Geschlechtsunterschiede im Gitter-Häng-Tests	47
Abb. 18: PV IN Dichte	49
Abb. 19: SOM IN Dichte	50
Abb. 20: Dichte und Umsatzrate von dendritischen Spines von SOM IN ↑	52
Abb. 21: Beispiel präsymptomatischer Dendriten	52
Abb. 22: Spine Formations- und Verlustrate bzw. Überlebensfraktion	53
Abb. 23: Umsatzrate der dendritischen Spines von SOM IN ↑	53
Abb. 24: Bouton Dichte und Überlebensfraktion	54
Abb. 25: Bouton Verlust-, Formations- und Umsatzrate	55
Tab. 1: Übersicht GABAerge Interneuronen [Tremblay et al., 2016]	22
Tab. 2: Materialliste	34
Tab. 3: SOD-Score	35
Tab. 4: Alter der Versuchskohorten	36
Tab. 5: Zur Färbung verwendete Antikörper	42
Tab. 6: Maße der Kortizes entnommen aus dem „Allen Mouse Brain Atlas“ [AllenInstitute] ..	42
Tab. 7: Geschlechterverteilung der untersuchten Tiere präoperativ	48
Tab. 8: Anzahl an auswertbaren Sektionen	49
Tab. 9: Quantität der mikroskopierten Strukturen	51

14 Bibliographie

- Acevedo-Aroza, A., Kalmar, B., Essa, S., Ricketts, T., Joyce, P., Kent, R., Rowe, C., Parker, A., Gray, A., Hafezparast, M., Thorpe, J.R., Greensmith, L., Fisher, E.M.C. A comprehensive assessment of the SOD1G93A low-copy transgenic mouse, which models human amyotrophic lateral sclerosis. *Disease Models & Mechanisms* **4**, 686-700 (2011). DOI: 10.1242/dmm.007237
- Alexander, G.M., Erwin, K.L., Byers, N., Deitch, J.S., Augelli, B.J., Blankenhorn, E.P., Heiman-Patterson, T.D. Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Molecular Brain Research* **130**, 7-15 (2004). DOI: 10.1016/j.molbrainres.2004.07.002
- AllenInstitute. Allen Mouse Brain Atlas. (https://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100142143?image_type=atlas), Stand: 29.10.2023
- ALSAssociation. Lou Gehrig and the History of ALS. (<https://www.als.org/understanding-als/lou-gehrig>), Stand: 14.05.2021
- ALSoD. Amyotrophic Lateral Sclerosis online Database. (<https://alsod.ac.uk/>), Stand: 15.05.2021
- Alstermark, B., Ogawa, J., Isa, T. Lack of Monosynaptic Corticomotoneuronal EPSPs in Rats: Disynaptic EPSPs Mediated Via Reticulospinal Neurons and Polysynaptic EPSPs Via Segmental Interneurons. *J Neurophysiol* **91**, 1832-1839 (2004). DOI: 10.1152/jn.00820.2003
- Alves, C.J., de Santana, L.P., dos Santos, A.J.D., de Oliveira, G.P., Duobles, T., Scorisa, J.M., Martins, R.S., Maximino, J.R., Chadi, G. Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Research* **1394**, 90-104 (2011). DOI: 10.1016/j.brainres.2011.02.060
- Andrés-Benito, P., Moreno, J., Aso, E., Povedano, M., Ferrer, I. Amyotrophic lateral sclerosis, gene deregulation in the anterior horn of the spinal cord and frontal cortex area 8: implications in frontotemporal lobar degeneration. *Aging* **9**, 823-851 (2017). DOI: 10.18632/aging.101195
- Armon, C. An Evidence-Based Medicine Approach to the Evaluation of the Role of Exogenous Risk Factors in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuroepidemiology* **22**, 217-228 (2003). DOI: 10.1159/000070562
- Aronica, E., Baas, F., Iyer, A., ten Asbroek, A.L.M.A., Morello, G., Cavallaro, S. Molecular classification of amyotrophic lateral sclerosis by unsupervised clustering of gene expression in motor cortex. *Neurobiology of Disease* **74**, 359-376 (2015). DOI: 10.1016/j.nbd.2014.12.002
- Atanasio, A., Decman, V., White, D., Ramos, M., Ikiz, B., Lee, H.-C., Siao, C.-J., Brydges, S., Larosa, E., Bai, Y., Fury, W., Burfeind, P., Zamfirova, R., Warshaw, G., Orengo, J., Oyejide, A., Fralish, M., Auerbach, W., Poueymirou, W., Freudenberg, J., Gong, G., Zambrowicz, B., Valenzuela, D., Yancopoulos, G., Murphy, A., Thurston, G., Lai, K.-M.V. C9orf72 ablation causes immune dysregulation characterized by leukocyte expansion, autoantibody production and glomerulonephropathy in mice. *Scientific Reports* **6**, 23204 (2016). DOI: 10.1038/srep23204
- Baker, M.R. ALS—dying forward, backward or outward? *Nature Reviews Neurology* **10**, 660-660 (2014). DOI: 10.1038/nrneurol.2013.221-c1
- Barber, S.C., Shaw, P.J. Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radical Biology & Medicine* **48**, 629-641 (2010). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.018
- Bastrikova, N., Gardner, G.A., Reece, J.M., Jeromin, A., Dudek, S.M. Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 3123-3127 (2008). DOI: 10.1073/pnas.0800027105
- Bataveljić, D., Nikolić, L., Milosević, M., Todorović, N., Andjus, P.R. Changes in the Astrocytic Aquaporin-4 and Inwardly Rectifying Potassium Channel Expression in the Brain of the Amyotrophic Lateral Sclerosis SOD1G93A Rat Model. *Glia* **60**, 1991-2003 (2012). DOI: 10.1002/glia.22414
- Bellantuono, I., de Cabo, R., Ehninger, D., Di Germanio, C., Lawrie, A., Miller, J., Mitchell, S.J., Navas-Enamorado, I., Potter, P.K., Tchkonja, T., Trejo, J.L., Lamming, D.W. A toolbox for the longitudinal assessment of healthspan in aging mice. *Nature Protocols* **15**, 540-574 (2020). DOI: 10.1038/s41596-019-0256-1
- Bellmann, J., Abo-Rady, M., Monette, A., Tripathy, V., Sójka, A., Janosh, A., Bhatnagar, R., Sternecker, J. Viral Infections Exacerbate FUS-ALS Phenotypes in iPSC-Derived Spinal Neurons in a Virus Species-Specific Manner. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 480 (2019). DOI: 10.3389/fncel.2019.00480
- Bendotti, C., Tortarolo, M., Suchak, S.K., Calvaresi, N., Carvelli, L., Bastone, A., Rizzi, M., Rattray, M., Mennini, T. Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *Journal of Neurochemistry* **79**, 737-746 (2001). DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00572.x

- Blokhuis, A.M., Groen, E.J.N., Koppers, M., Van Den Berg, L.H., Pasterkamp, R.J. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica* **125**, 777-794 (2013). DOI: 10.1007/s00401-013-1125-6
- Boillee, 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* **312**, 1389-1392 (2006). DOI: 10.1126/science.1123511
- Boyce, M., Bryant, K.F., Jousse, C.L., Long, K., Harding, H.P., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ma, D., Coen, D.M., Ron, D., Yuan, J. A Selective Inhibitor of eIF2a Dephosphorylation Protects Cells from ER Stress. *Science* **307**, 935-939 (2005). DOI: 10.1126/science.1101902
- Braak, H., Brettschneider, J., Ludolph, A.C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Tredici, K.D. Amyotrophic lateral sclerosis—a model of corticofugal axonal spread. *Nature Reviews Neurology* **9**, 708-714 (2013). DOI: 10.1038/nrneurol.2013.221
- Brettschneider, J., Del Tredici, K., Toledo, J.B., Robinson, J.L., Irwin, D.J., Grossman, M., Suh, E., Van Deerlin, V.M., Wood, E.M., Baek, Y., Kwong, L., Lee, E.B., Elman, L., Mccluskey, L., Fang, L., Feldengut, S., Ludolph, A.C., Lee, V.M.-Y., Braak, H., Trojanowski, J.Q. Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology* **74**, 20-38 (2013). DOI: 10.1002/ana.23937
- Brown, R.H., Al-Chalabi, A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine* **377**, 162-172 (2017). DOI: 10.1056/nejmra1603471
- Brujin, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L., Cleveland, D.W. ALS-Linked SOD1 Mutant G85R Mediates Damage to Astrocytes and Promotes Rapidly Progressive Disease with SOD1-Containing Inclusions. *Neuron* **18**, 327-338 (1997). DOI: 10.1016/s0896-6273(00)80272-x
- Brujin, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W., Cleveland, D.W. Aggregation and Motor Neuron Toxicity of an ALS-Linked SOD1 Mutant Independent from Wild-Type SOD1. *Science* **281**, 1851-1854 (1998). DOI: 10.1126/science.281.5384.1851
- Brunet, A., Stuart-Lopez, G., Burg, T., Scekic-Zahirovic, J., Rouaux, C. Cortical Circuit Dysfunction as a Potential Driver of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Neuroscience* **14**(2020). DOI: 10.3389/fnins.2020.00363
- Butt, S.J.B., Stacey, J.A., Teramoto, Y., Vagnoni, C. A role for GABAergic interneuron diversity in circuit development and plasticity of the neonatal cerebral cortex. *Current Opinion in Neurobiology* **43**, 149-155 (2017). DOI: 10.1016/j.conb.2017.03.011
- Caroni, P., Donato, F., Muller, D. Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nature Reviews Neurosciences* **13**, 478-490 (2012). DOI: 10.1038/nrn3258
- Cengiz, B., Fidanci, H., Keceli, Y.K., Baltaci, H., Kuruoglu, R. Impaired Short- and Long-Latency afferent Inhibition in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Muscle & Nerve* **59**, 699–704 (2019). DOI: 10.1002/mus.26464
- Cengiz, B., Kuruoglu, R. A new parameter to discriminate amyotrophic lateral sclerosis patients from healthy participants by motor cortical excitability changes. *Muscle & Nerve* **61**, 345-362 (2020). DOI: 10.1002/mus.26786
- Chang, Q., Martin, L.J. Glycinergic Innervation of Motoneurons Is Deficient in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. *The American Journal of Pathology* **174**, 574-585 (2009). DOI: 10.2353/ajpath.2009.080557
- Chen, J.L., Flanders, G.H., Lee, W.-C.A., Lin, W.C., Nedivi, E. Inhibitory Dendrite Dynamics as a General Feature of the Adult Cortical Microcircuit. *The Journal of Neuroscience* **31**, 12437-12443 (2011a). DOI: 10.1523/jneurosci.0420-11.2011
- Chen, J.L., Lin, W.C., Cha, J.W., So, P.T., Kubota, Y., Nedivi, E. Structural basis for the role of inhibition in facilitating adult brain plasticity. *Nature Neuroscience* **14**, 587-594 (2011b). DOI: 10.1038/nn.2799
- Chidambaram, S.B., Rathipriya, A.G., Bolla, S.R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A.M., Manivasagam, T., Thenmozhi, A.J., Essa, M.M., Guillemin, G.J., Chandra, R., Sakharkar, M.K. Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* **92**, 161–193 (2019). DOI: 10.1016/j.pnpbp.2019.01.005
- Clark, R.M., Blizzard, C.A., Young, K.M., King, A.E., Dickson, T.C. Calretinin and Neuropeptide Y interneurons are differentially altered in the motor cortex of the SOD1G93A mouse model of ALS. *Scientific Reports* **7**, 44461 (2017). DOI: 10.1038/srep44461

- Clark, R.M., Brizuela, M., Blizzard, C.A., Dickson, T.C. Reduced Excitability and Increased Neurite Complexity of Cortical Interneurons in a Familial Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **12**(2018). DOI: 10.3389/fncel.2018.00328
- Cleveland, D.W., Laing, N., Hulse, P.V., Brown, R.H. Toxic mutants in Charcot's sclerosis. *Nature* **378**, 342-343 (1995). DOI: 10.1038/378342a0
- Côté, M.-P., Murray, L.M., Knikou, M. Spinal Control of Locomotion: Individual Neurons, Their Circuits and Functions. *Front. Physiol.* **9**, 784 (2018). DOI: 10.3389/fphys.2018.00784
- Cudkovicz, M.E., Shefner, J.M., Schoenfeld, D.A., Zhang, H., Andreasson, K.I., Rothstein, J.D., Drachman, D.B. Trial of Celecoxib in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Annals of Neurology* **60**, 22-31 (2006). DOI: 10.1002/ana.20903
- Danbolt, N.C. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* **65** (2001) **65**, 1–105 (2001). DOI: 10.1016/s0301-0082(00)00067-8
- De Paola, V., Holtmaat, A., Knott, G., Song, S., Wilbrecht, L., Caroni, P., Svoboda, K. Cell Type-Specific Structural Plasticity of Axonal Branches and Boutons in the Adult Neocortex. *Neuron* **49**, 861-875 (2006). DOI: 10.1016/j.neuron.2006.02.017
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.-Y.R., Karydas, A., Seeley, W.W., Josephs, K.A., Coppola, G., Geschwind, D.H., Wszolek, Z.K., Feldman, H., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Miller, B.L., Dickson, D.W., Boylan, K.B., Graff-Radford, N.R., Rademakers, R. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* **72**, 245-256 (2011). DOI: 10.1016/j.neuron.2011.09.011
- Delestrée, N., Manuel, M., Iglesias, C., Elbasiouny, S.M., Heckman, C.J., Zytnicki, D. Adult spinal motoneurons are not hyperexcitable in a mouse model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* **592.7**, 1687–1703 (2014). DOI: 10.1113/jphysiol.2013.265843
- Denk, W., Strickler, J.H., Webb, W.W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**, 73-76 (1990). DOI: 10.1126/science.2321027
- Do-Ha, D., Buskila, Y., Ooi, L. Impairments in Motor Neurons, Interneurons and Astrocytes Contribute to Hyperexcitability in ALS: Underlying Mechanisms and Paths to Therapy. *Molecular Neurobiology* **55**, 1410-1418 (2018). DOI: 10.1007/s12035-017-0392-y
- Eisen, A. The Dying Forward Hypothesis of ALS: Tracing Its History. *Brain Sciences* **11**, 300 (2021). DOI: 10.3390/brainsci11030300
- Eisen, A., Braak, H., Del Tredici, K., Lemon, R., Ludolph, A.C., Kiernan, M.C. Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **88**, 917-924 (2017). DOI: 10.1136/jnnp-2017-315573
- Eliceiri, K., Jug, F., Saalfeld, S., Preibisch, S., Tomancak, P., Carpenter, A., Berthold, M., Swedlow, J. Fiji. (<https://imagej.net/people/>), Stand: 06.06.2022
- Elston, G.N. Cortex, Cognition and the Cell: New Insights into the Pyramidal Neuron and Prefrontal Function. *Cerebral Cortex* **13**, 1124-1138 (2003). DOI: 10.1093/cercor/bhg093
- Fang, F., Ingre, C., Roos, P., Kamel, F., Piehl, F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Epidemiology* **7**, 181-193 (2015). DOI: 10.2147/clep.s37505
- Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A., Glass, J.D. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental Neurology* **185**, 232–240 (2004). DOI: 10.1016/j.expneurol.2003.10.004
- Fogarty, M.J., Klenowski, P.M., Lee, J.D., Driberg-Thompson, J.R., Bartlett, S.E., Ngo, S.T., Hilliard, M.A., Bellingham, M.C., Noakes, P.G. Cortical synaptic and dendritic spine abnormalities in a presymptomatic TDP-43 model of amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports* **6**, 37968 (2016a). DOI: 10.1038/srep37968
- Fogarty, M.J., Mu, E.W.H., Bellingham, M.C. Motor Areas Show Altered Dendritic Structure in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *Frontiers in Neuroscience* **111**, 609 (2017). DOI: 10.3389/fnins.2017.00609
- Fogarty, M.J., Mu, E.W.H., Noakes, P.G., Lavidis, N.A., Bellingham, M.C. Marked changes in dendritic structure and spine density precede significant neuronal death in vulnerable cortical pyramidal neuron populations in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica Communications* **4**(2016b). DOI: 10.1186/s40478-016-0347-y
- 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. *The Journal of Neuroscience* **35**, 643-647 (2015). DOI: 10.1523/jneurosci.3483-14.2015

- Freund, T.F., Buzsaki, G. Interneurons of the Hippocampus. *Hippocampus* **6**, 347-470 (1996). DOI: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I
- Fu, M., Yu, X., Lu, J., Zuo, Y. Repetitive Motor Learning induces coordinated formation of clustered Dendritic Spines in vivo. *Nature* **483**, 92-95 (2012). DOI: 10.1038/nature10844
- Genç, B., Jara, J.H., Lagrimas, A.K.B., Pytel, P., Roos, R.P., Mesulam, M.M., Geula, C., Bigio, E.H., Özdinler, P.H. Apical dendrite degeneration, a novel cellular pathology for Betz cells in ALS. *Scientific Reports* **7**, 41765 (2017). DOI: 10.1038/srep41765
- Gilabert-Juan, J., Castillo-Gomez, E., Pérez-Rando, M., Moltó, M.D., Nacher, J. Chronic stress induces changes in the structure of interneurons and in the expression of molecules related to neuronal structural plasticity and inhibitory neurotransmission in the amygdala of adult mice. *Experimental Neurology* **232**, 33-40 (2011). DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.07.009
- Gilabert-Juan, J., Guirado, R., Nacher, J., Castillo-Gomez, E., Moltó, M.D. Chronic stress alters inhibitory networks in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Brain Structure and Function* **218**, 1591-1605 (2012). DOI: 10.1007/s00429-012-0479-1
- Giordana, M.T., Ferrero, P., Grifoni, S., Pellerino, A., Naldi, A., Montuschi, A. Dementia and cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a review. *Neurological Sciences* **32**, 9-16 (2011). DOI: 10.1007/s10072-010-0439-6
- Goetz, C.G. Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. *Muscle Nerve* **23**, 336-343 (2000).
- Goldberg, E.M., Coulter, D.A. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience* **14**, 337-349 (2013). DOI: 10.1038/nrn3482
- González-Albo, M.C., Elston, G.N., DeFelipe, J. The Human Temporal Cortex: Characterization of Neurons Expressing Nitric Oxide Synthase, Neuropeptides and Calcium-binding Proteins, and their Glutamate Receptor Subunit Profiles. *Cerebral Cortex* **11**, 1170–1181 (2001). DOI: 10.1093/cercor/11.12.1170
- 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., Neville, H.E., Boylan, K., Mozaffar, T., Belsh, J.M., Ravits, J., Bedlack, R.S., Graves, M.C., McCluskey, L.F., Barohn, R.J., Tandan, R. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet Neurol.* **6**, 1045-1053 (2007). DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70270-3
- Grutzendler, J., Kasthuri, N., Gan, W.-B. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* **420**, 812-816 (2002). DOI: 10.1038/nature01276
- Gu, Q. Neuromodulatory Transmitter Systems in the Cortex and their Role in Cortical Plasticity. *Neuroscience* **111**, 815-835 (2002). DOI: 10.1016/s0306-4522(02)00026-x
- Guirado, R., Perez-Rando, M., Sanchez-Matarredona, D., Castillo-Gómez, E., Liberia, T., Rovira-Esteban, L., Varea, E., Crespo, C., Blasco-Ibáñez, J.M., Nacher, J. The Dendritic Spines of Interneurons Are Dynamic Structures Influenced by PSA-NCAM Expression. *Cerebral Cortex* **24**, 3014-3024 (2014). DOI: 10.1093/cercor/bht156
- Gunes, Z.I., Kan, V.W.Y., Ye, X., Liebscher, S. Exciting Complexity: The Role of Motor Circuit Elements in ALS Pathophysiology. *frontiers in Neuroscience* **14**(2020). DOI: 10.3389/fnins.2020.00573
- 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., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R.L., Siddique, T. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772-1775 (1994). DOI: 10.1126/science.8209258
- Haidet-Phillips, A.M., Hester, M.E., Miranda, C.J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M.J., Foust, K.D., Rao, M., Eagle, A., Kammesheidt, A., Christensen, A., Mendell, J.R., Burghes, A.H.M., Kaspar, B.K. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature Biotechnology* **29**, 824-828 (2011). DOI: 10.1038/nbt.1957
- Hammer, R.P.J., Tomiyasu, U., Scheibel, A.B. Degeneration of the Human Betz Cell Due to Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Experimental Neurology* **63**, 336-346 (1979). DOI: 10.1016/0014-4886(79)90129-8
- Harratz, M.M., Marden, J.J., Zhou, W., Zhang, Y., Williams, A., Sharov, V.S., Nelson, K., Luo, M., Paulson, H., Schöneich, C., Engelhardt, J.F. SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *Journal of Clinical Investigation* (2008). DOI: 10.1172/jci34060
- Harris, K.D., Shepherd, G.M.G. The neocortical circuit: themes and variations. *Nature Neuroscience* **18**, 170-181 (2015). DOI: 10.1038/nn.3917
- Herms, J., Dorostkar, M.M. Dendritic Spine Pathology in Neurodegenerative Diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **11**, 221–252 (2016). DOI: 10.1146/annurev-pathol-012615-044216

- Hofer, S.B., Mrcic-Flogel, T.D., Bonhoeffer, T., Hübener, M. Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature* **457**, 313-318 (2009). DOI: 10.1038/nature07487
- Holtmaat, A., Bonhoeffer, T., Chow, D.K., Chuckowree, J., De Paola, V., Hofer, S.B., Hübener, M., Keck, T., Knott, G., Lee, W.-C.A., Mostany, R., Mrcic-Flogel, T.D., Nedivi, E., Portera-Cailliau, C., Svoboda, K., Trachtenberg, J.T., Wilbrecht, L. Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nature Protocols* **4**, 1128-1144 (2009a). DOI: 10.1038/nprot.2009.89
- Holtmaat, A., Svoboda, K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews Neuroscience* **10**, 647–658 (2009b). DOI: 10.1038/nrn2699
- Holtmaat, A.J.G.D., Trachtenberg, J.T., Shepherd, G.M., Knott, G.W., Wilbrecht, L., Zhang, X., Svoboda, K. Transient and Persistent Dendritic Spines in the Neocortex In Vivo. *Neuron* **45**, 279–291 (2005). DOI: 10.1016/j.neuron.2005.01.003
- Horn, A.K.E., Leigh, R.J. The anatomy and physiology of the ocular motor system. *Handbook of Clinical Neurology* **102**, 21-69 (2011). DOI: 10.1016/B978-0-444-52903-9.00008-X
- Howland, D.S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N.J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., DeGennaro, L.J., Cleveland, D.W., Rothstein, J.D. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 1604-1609 (2002). DOI: 10.1073/pnas.032539299
- Iba, M., Guo, J.L., McBride, J.D., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y. Synthetic Tau Fibrils Mediate Transmission of Neurofibrillary Tangles in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's-Like Tauopathy. *The Journal of Neuroscience* **33**, 1024-1037 (2013). DOI: 10.1523/jneurosci.2642-12.2013
- JacksonLaboratory. B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J. (<https://www.jax.org/strain/004435>), Stand: 29.10.2023
- JacksonLaboratory. B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)dl1Gur/J. (<https://www.jax.org/strain/002299>), Stand: 29.10.2023
- JacksonLaboratory. FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J. (<https://www.jax.org/strain/003718>), Stand: 29.10.2023
- Jacobs, B. Regional Dendritic and Spine Variation in Human Cerebral Cortex: a Quantitative Golgi Study. *Cerebral Cortex* **11**, 558-571 (2001). DOI: 10.1093/cercor/11.6.558
- Jaiswal, M.K. Riluzole But Not Melatonin Ameliorates Acute Motor Neuron Degeneration and Moderately Inhibits SOD1-Mediated Excitotoxicity Induced Disrupted Mitochondrial Ca²⁺ Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in cellular neuroscience* **10**, 295 (2017). DOI: 10.3389/fncel.2016.00295
- Jaiswal, M.K. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Medicinal Research Reviews* **39**, 733-748 (2019). DOI: 10.1002/med.21528
- Jara, J.H., Genç, B., Klessner, J.L., Özdinler, P.H. Retrograde labeling, transduction, and genetic targeting allow cellular analysis of corticospinal motor neurons: implications in health and disease. *Frontiers in Neuroanatomy* **8**(2014). DOI: 10.3389/fnana.2014.00016
- Jara, J.H., Villa, S.R., Khan, N.A., Bohn, M.C., Özdinler, P.H. AAV2 mediated retrograde transduction of corticospinal motor neurons reveals initial and selective apical dendrite degeneration in ALS. *Neurobiology of Disease* **47**, 174-183 (2012). DOI: 10.1016/j.nbd.2012.03.036
- Jiang, Y.-M., Yamamoto, M., Liang, Y., Katsuno, M., Doyu, M., Terao, S., Takeuchi, H., Adachi, H., Kobayashi, Y., Niwa, J.-i., Yoshihara, T., Ishigaki, S., Tanaka, F., Yoshida, M., Hashizume, Y., Sobue, G. Gene Expression Profile of Spinal Motor Neurons in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol* **57**, 236–251 (2005). DOI: 10.1002/ana.20379
- Jones, E.G., Powell, T.P.S. Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *Journal of Cell Science* **5**, 509-529 (1969). DOI: 10.1242/jcs.5.2.509
- Jovičić, A., Mertens, J., Boeynaems, S., Bogaert, E., Chai, N., Yamada, S.B., Paul, J.W., Sun, S., Herdy, J.R., Bieri, G., Kramer, N.J., Gage, F.H., Van Den Bosch, L., Robberecht, W., Gitler, A.D. Modifiers of C9orf72 dipeptide repeat toxicity connect nucleocytoplasmic transport defects to FTD/ALS. *Nature Neuroscience* **18**, 1226-1229 (2015). DOI: 10.1038/nn.4085
- Julian, T.H., Glasgow, N., Barry, A.D.F., Moll, T., Harvey, C., Klimentidis, Y.C., Newell, M., Zhang, S., Snyder, M.P., Cooper-Knock, J., Shaw, P.J. Physical exercise is a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: Convergent evidence from Mendelian randomisation, transcriptomics and risk genotypes. *EBioMedicine* **68**, 103397 (2021). DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103397
- Kabashi, E., Agar, J.N., Taylor, D.M., Minotti, S., Durham, H.D. Focal dysfunction of the proteasome: a pathogenic factor in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry* **89**, 1325-1335 (2004). DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02453.x

- Kanai, K., Kuwabara, S., Misawa, S., Tamura, N., Ogawara, K., Nakata, M., Sawai, S., Hattori, T., Bostock, H. Altered axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis: impaired potassium channel function related to disease stage. *Brain* **129**, 953–962 (2006). DOI: 10.1093/brain/awl024
- Kang, S.H., Li, Y., Fukaya, M., Lorenzini, I., Cleveland, D.W., Ostrow, L.W., Rothstein, J.D., Bergles, D.E. Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience* **16**, 571-579 (2013). DOI: 10.1038/nn.3357
- Kawamata, H., Manfredi, G. Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mechanisms of Ageing and Development* **131**, 517-526 (2010). DOI: 10.1016/j.mad.2010.05.003
- Keck, T., Scheuss, V., Jacobsen, R.I., Wierenga, Corette J., Eysel, Ulf T., Bonhoeffer, T., Hübener, M. Loss of Sensory Input Causes Rapid Structural Changes of Inhibitory Neurons in Adult Mouse Visual Cortex. *Neuron* **71**, 869-882 (2011). DOI: 10.1016/j.neuron.2011.06.034
- Khademullah, C.S., Aqrabawi, A.J., Place, K.M., Dargaei, Z., Liang, X., Pressey, J.C., Bedard, S., Yang, J.W., Garand, D., Keramidis, I., Gasecka, A., Côté, D., De Koninck, Y., Keith, J., Zinman, L., Robertson, J., Kim, J.C., Woodin, M.A. Cortical interneuron-mediated inhibition delays the onset of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **143**, 800-810 (2020). DOI: 10.1093/brain/awaa034
- Kim, D.-Y., Oh, B.-M., Paik, N.-J. Excitability Profile of Motor Evoked Potentials and Silent Periods. *International Journal of Neuroscience* **115**, 267-283 (2005). DOI: 10.1080/00207450590519553
- Kim, J., Hughes, E.G., Shetty, A.S., Arlotta, P., Goff, L.A., Bergles, D.E., Brown, S.P. Changes in the Excitability of Neocortical Neurons in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis Are Not Specific to Corticospinal Neurons and Are Modulated by Advancing Disease. *The Journal of Neuroscience* **37**, 9037-9053 (2017). DOI: 10.1523/jneurosci.0811-17.2017
- Kipp, M., Radlanski, K. *Neuroanatomie - Nachschlagen | Lernen | Verstehen*, (KVM - Der Medizinverlag, 2022). ISBN: 978-3-86867-599-3
- Koch, C., Poggio, T., Torre, V. Nonlinear interactions in a dendritic tree: localization, timing, and role in information processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**, 2799-2802 (1983). DOI: 10.1073/pnas.80.9.2799
- Koerner, D.R. Amyotrophic lateral sclerosis on Guam: A clinical study and review of the literature. *Annals of Internal Medicine* **37**, 1204-1220 (1952).
- Kopec, C.D., Li, B., Wei, W., Boehm, J., Malinow, R. Glutamate Receptor Exocytosis and Spine Enlargement during Chemically Induced Long-Term Potentiation. *The Journal of Neuroscience* **26**, 2000-2009 (2006). DOI: 10.1523/jneurosci.3918-05.2006
- Koppers, M., Blokhuis, A.M., Westeneng, H.J., Terpstra, M.L., Zundel, C.A.C., Vieira De Sá, R., Schellevis, R.D., Waite, A.J., Blake, D.J., Veldink, J.H., Van Den Berg, L.H., Pasterkamp, R.J. C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Annals of Neurology* **78**, 426-438 (2015). DOI: 10.1002/ana.24453
- Kweon, J.H., Kim, S., Lee, S.B. The cellular basis of dendrite pathology in neurodegenerative diseases. *BMB Rep.* **50(1)**, 5-11 (2017). DOI: 10.5483/BMBRep.2017.50.1.131
- Kwon, I., Xiang, S., Kato, M., Wu, L., Theodoropoulos, P., Wang, T., Kim, J., Yun, J., Xie, Y., Mcknight, S.L. Poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeats bind nucleoli, impede RNA biogenesis, and kill cells. *Science* **345**, 1139-1145 (2014). DOI: 10.1126/science.1254917
- La Spada, A.R., Taylor, J.P. Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nature Reviews Genetics* **11**, 247-258 (2010). DOI: 10.1038/nrg2748
- Leal, S.S., Gomes, C.M. Calcium dysregulation links ALS defective proteins and motor neuron selective vulnerability. *Frontiers in cellular Neuroscience* **9**, 225 (2015). DOI: 10.3389/fncel.2015.00225
- Lederer, C.W., Torrisi, A., Pantelidou, M., Santama, N., Cavallaro, S. Pathways and genes differentially expressed in the motor cortex of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Genomics* **8**(2007). DOI: 10.1186/1471-2164-8-26
- Lee, W.-C.A., Chen, J.L., Huang, H., Leslie, J.H., Amitai, Y., So, P.T., Nedivi, E. A dynamic zone defines interneuron remodeling in the adult neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 19968-19973 (2008). DOI: 10.1073/pnas.0810149105
- Lee, W.-C.A., Huang, H., Feng, G., Sanes, J.R., Brown, E.N., So, P.T., Nedivi, E. Dynamic Remodeling of Dendritic Arbors in GABAergic Interneurons of Adult Visual Cortex. *PLoS Biology* **4**, 271-280 (2006). DOI: 10.1371/journal.pbio.0040029
- Lee, Y., Morrison, B.M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M.H., Hoffman, P.N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P.-W., Pellerin, L., Magistretti, P.J., Rothstein, J.D. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* **487**, 443-448 (2012). DOI: 10.1038/nature11314

- Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., Chen, L., Chen, L., Chen, T.-M., Chi Chin, M., Chong, J., Crook, B.E., Czaplinska, A., Dang, C.N., Datta, S., Dee, N.R., Desaki, A.L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T.A., Donelan, M.J., Dong, H.-W., Dougherty, J.G., Duncan, B.J., Ebbert, A.J., Eichele, G., Estin, L.K., Faber, C., Facer, B.A., Fields, R., Fischer, S.R., Fliss, T.P., Frensley, C., Gates, S.N., Glattfelder, K.J., Halverson, K.R., Hart, M.R., Hohmann, J.G., Howell, M.P., Jeung, D.P., Johnson, R.A., Karr, P.T., Kawal, R., Kidney, J.M., Knapik, R.H., Kuan, C.L., Lake, J.H., Laramée, A.R., Larsen, K.D., Lau, C., Lemon, T.A., Liang, A.J., Liu, Y., Luong, L.T., Michaels, J., Morgan, J.J., Morgan, R.J., Mortrud, M.T., Mosqueda, N.F., Ng, L.L., Ng, R., Orta, G.J., Overly, C.C., Pak, T.H., Parry, S.E., Pathak, S.D., Pearson, O.C., Puchalski, R.B., Riley, Z.L., Rockett, H.R., Rowland, S.A., Royall, J.J., Ruiz, M.J., Sarno, N.R., Schaffnit, K., Shapovalova, N.V., Sivasay, T., Slaughterbeck, C.R., Smith, S.C., Smith, K.A., Smith, B.I., Sodt, A.J., Stewart, N.N., Stumpf, K.-R., Sunkin, S.M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C.D., Thaller, C., Thompson, C.L., Varnam, L.R., Visel, A., Whitlock, R.M., Wohnoutka, P.E., Wolkey, C.K., Wong, V.Y., Wood, M., Yaylaoglu, M.B., Young, R.C., Youngstrom, B.L., Feng Yuan, X., Zhang, B., Zwingman, T.A., Jones, A.R. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* **445**, 168-176 (2007). DOI: 10.1038/nature05453
- Lemon, R.N. Descending Pathways in Motor Control. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 195-218 (2008). DOI: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125547
- Lendvai, B., Stern, E.A., Chen, B., Svoboda, K. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* **404**, 876-881 (2000). DOI: 10.1038/35009107
- Lepore, A.C., Rauck, B., Dejea, C., Pardo, A.C., Rao, M.S., Rothstein, J.D., Maragakis, N.J. Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nature Neuroscience* **11**, 1294-1301 (2008). DOI: 10.1038/nn.2210
- Leroy, F., d'Incamps, B.L., Imhoff-Manuel, R.D., Zytnicki, D. Early intrinsic hyperexcitability does not contribute to motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *eLife* **2014**;3:e04046. DOI: 10.7554/eLife.04046 **3**, e04046 (2014). DOI: 10.7554/eLife.04046.002
- Lewis, D.A. Inhibitory neurons in human cortical circuits: substrate for cognitive dysfunction in schizophrenia. *Current Opinion in Neurobiology* **26**, 22-26 (2014). DOI: 10.1016/j.conb.2013.11.003
- Liebscher, S., Meyer-Luehmann, M. A peephole into the brain: neuropathological features of Alzheimer's disease revealed by in vivo two-photon imaging. *Frontiers in Psychiatry* **3**, 26 (2012). DOI: 10.3389/fpsy.2012.00026
- Liebscher, S., Page, R.M., Käfer, K., Winkler, E., Quinn, K., Goldbach, E., Brigham, E.F., Quincy, D., Basi, G.S., Schenk, D.B., Steiner, H., Bonhoeffer, T., Haass, C., Meyer-Luehmann, M., Hübener, M. Chronic γ -secretase inhibition reduces amyloid plaque-associated instability of pre- and postsynaptic structures. *Molecular Psychiatry* **19**, 937-946 (2014). DOI: 10.1038/mp.2013.122
- Lin, C.-L.G., Bristol, L.A., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Crawford, T., Clawson, L., Rothstein, J.D. Aberrant RNA Processing in a Neurodegenerative Disease: the Cause for Absent EAAT2, a Glutamate Transporter, in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuron* **20**, 589-602 (1998). DOI: 10.1016/s0896-6273(00)80997-6
- Liu, G., Ou, S., Cui, H., Li, X., Yin, Z., Gu, D., Wang, Z. Head Injury and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Meta-Analysis. *Neuroepidemiology* **55**, 11-19 (2021). DOI: 10.1159/000510987
- Longinetti, E., Fang, F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Current opinion in neurology* **32**, 771-776 (2019). DOI: 10.1097/WCO.0000000000000730
- Ludolph, A.C., Petri, S., Großkreutz, J. Motoneuronkrankungen (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie). **AWMF S1-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie**(2021).
- Lulé, D.E., Aho-Özhan, H.E.A., Vázquez, C., Weiland, U., Weishaupt, J.H., Otto, M., Anderl-Straub, S., Semler, E., Uttner, I., Ludolph, A.C. Story of the ALS-FTD continuum retold: rather two distinct entities. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **0**, 1-4 (2018).
- Macías, M., Lopez-Virgen, V., Olivares-Moreno, R., Rojas-Piloni, G. Corticospinal neurons from motor and somatosensory cortices exhibit different temporal activity dynamics during motor learning. *Frontiers in Human Neuroscience* **16**(2022). DOI: 10.3389/fnhum.2022.1043501
- Maekawa, S., Al-Sarraj, S., Kibble, M., Landau, S., Parnavelas, J., Cotter, D., Everall, I., Leigh, P.N. Cortical selective vulnerability in motor neuron disease: a morphometric study. *Brain* **127**, 1237-1251 (2004). DOI: 10.1093/brain/awh132
- Marcuzzo, S., Terragni, B., Bonanno, S., Isaia, D., Cavalcante, P., Cappelletti, C., Ciusani, E., Rizzo, A., Regalia, G., Yoshimura, N., Ugolini, G.S., Rasponi, M., Bechi, G., Mantegazza, M., Mantegazza, R., Bernasconi, P., Minati, L. Hyperexcitability in Cultured Cortical Neuron Networks

- from the G93A-SOD1 Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Mouse and its Molecular Correlates. *Neuroscience* **416**, 88-99 (2019). DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.07.041
- Marín, O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience* **13**, 107-120 (2012). DOI: 10.1038/nrn3155
- Marinković, P., Reuter, M.S., Brill, M.S., Godinho, L., Kerschensteiner, M., Misgeld, T. Axonal transport deficits and degeneration can evolve independently in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 4296-4301 (2012). DOI: 10.1073/pnas.1200658109
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R., Kasai, H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* **429**, 761-766 (2004). DOI: 10.1038/nature02617
- Mccampbell, A., Cole, T., Wegener, A.J., Tomassy, G.S., Setnicka, A., Farley, B.J., Schoch, K.M., Hoyer, M.L., Shabsovich, M., Sun, L., Luo, Y., Zhang, M., Thankamony, S., Salzman, D.W., Cudkowicz, M., Graham, D.L., Bennett, C.F., Kordasiewicz, H.B., Swayze, E.E., Miller, T.M. Antisense oligonucleotides extend survival and reverse decrement in muscle response in ALS models. *Journal of Clinical Investigation* **128**, 3558-3567 (2018). DOI: 10.1172/jci99081
- McGown, A., McDearmid, J.R., Panagiotaki, N., Tong, H., Al Mashhadi, S., Redhead, N., Lyon, A.N., Beattie, C.E., Shaw, P.J., Ramesh, T.M. Early interneuron dysfunction in ALS: Insights from a mutant sod1 zebrafish model. *Annals of Neurology* **73**, 246-258 (2013). DOI: 10.1002/ana.23780
- Mense, S. Motorisches System. in: Aumüller, G., Aust, G., Conrad, A., Engele, J., Kirsch, J., Maio, G., Mayerhofer, A., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte, E., Spanel-Borowski, K., Wennemuth, G., Wolff, W., Wurzinger, L.J. Hrsg. *Duale Reihe Anatomie. 5. korrigierte Auflage* (Thieme, Stuttgart, 2020).
- Miller, R.G., Mitchell, J.D., Moore, D.H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2012). DOI: 10.1002/14651858.cd001447.pub3
- Miller, T., Cudkowicz, M., Shaw, P.J., Andersen, P.M., Atassi, N., Bucelli, R.C., Genge, A., Glass, J., Ladha, S., Ludolph, A.L., Maragakis, N.J., Mcdermott, C.J., Pestronk, A., Ravits, J., Salachas, F., Trudell, R., Van Damme, P., Zinman, L., Bennett, C.F., Lane, R., Sandrock, A., Runz, H., Graham, D., Houshyar, H., Mccampbell, A., Nestorov, I., Chang, I., Mcneill, M., Fanning, L., Fradette, S., Ferguson, T.A. Phase 1–2 Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *New England Journal of Medicine* **383**, 109-119 (2020). DOI: 10.1056/nejmoa2003715
- Miller, T.M., Cudkowicz, M.E., Genge, A., Shaw, P.J., Sobue, G., Bucelli, R.C., Chiò, A., Van Damme, P., Ludolph, A.C., Glass, J.D., Andrews, J.A., Babu, S., Benatar, M., Mcdermott, C.J., Cochrane, T., Chary, S., Chew, S., Zhu, H., Wu, F., Nestorov, I., Graham, D., Sun, P., Mcneill, M., Fanning, L., Ferguson, T.A., Fradette, S. Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *New England Journal of Medicine* **387**, 1099-1110 (2022). DOI: 10.1056/nejmoa2204705
- Minciacchi, D., Kassa, R.M., Del Tongo, C., Mariotti, R., Bentivoglio, M. Voronoi-based spatial analysis reveals selective interneuron changes in the cortex of FALS mice. *Experimental Neurology* **215**, 77-86 (2009). DOI: 10.1016/j.expneurol.2008.09.005
- Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, P., Anderson, Kim, J., Hong, Mittag, T., Taylor, P., J. Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization. *Cell* **163**, 123-133 (2015). DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.015
- Mori, K., Arzberger, T., Grässer, F.A., Gijssels, I., May, S., Rentzsch, K., Weng, S.-M., Schludi, M.H., Van Der Zee, J., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., Kremmer, E., Kretzschmar, H.A., Haass, C., Edbauer, D. Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta Neuropathologica* **126**, 881-893 (2013). DOI: 10.1007/s00401-013-1189-3
- Moser, J.M., Bigini, P., Schmitt-John, T. The wobbler mouse, an ALS animal model. *Molecular Genetics and Genomics* **288**, 207-229 (2013). DOI: 10.1007/s00438-013-0741-0
- Münch, C., O'Brien, J., Bertolotti, A. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 3548-3553 (2011). DOI: 10.1073/pnas.1017275108
- Nägerl, U.V., Eberhorn, N., Cambridge, S.B., Bonhoeffer, T. Bidirectional Activity-Dependent Morphological Plasticity in Hippocampal Neurons. *Neuron* **44**, 759-767 (2004). DOI: 10.1016/j.neuron.2004.11.016
- 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., McCluskey, L.F., Miller, B.L., Masliah, E., Mackenzie, I.R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H.A., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y. Ubiquitinated TDP-

- 43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* **314**, 130-133 (2006). DOI: 10.1126/science.1134108
- Nieto-Gonzalez, J.L., Moser, J., Lauritzen, M., Schmitt-John, T., Jensen, K. Reduced GABAergic Inhibition Explains Cortical Hyperexcitability in the Wobbler Mouse Model of ALS. *Cerebral Cortex* **21**, 625-635 (2011). DOI: 10.1093/cercor/bhq134
- Nihei, K., McKee, A.C., Kowall, N.W. Patterns of neuronal degeneration in the motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathologica* **86**, 55-64 (1993). DOI: 10.1007/BF00454899
- Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., Ichijo, H. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes & Development* **22**, 1451-1464 (2008). DOI: 10.1101/gad.1640108
- Nolan, M., Scott, C., Gamarallage, M.P., Lunn, D., Carpenter, K., McDonough, E., Meyer, D., Kaanumalle, S., Santamaria-Pang, A., Turner, M.R., Talbot, K., Ansorge, O. Quantitative patterns of motor cortex proteinopathy across ALS genotypes. *Acta Neuropathologica Communications* **8**(2020). DOI: 10.1186/s40478-020-00961-2
- Oliva, A.A., Jiang, M., Lam, T., Smith, K.L., Swann, J.W. Novel Hippocampal Interneuronal Subtypes Identified Using Transgenic Mice That Express Green Fluorescent Protein in GABAergic Interneurons. *The Journal of Neuroscience* **20**, 3354-3368 (2000). DOI: 10.1523/jneurosci.20-09-03354.2000
- 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. *The Journal of Neuroscience* **31**, 4166-4177 (2011). DOI: 10.1523/jneurosci.4184-10.2011
- Pardo, A.C., Wong, V., Benson, L.M., Dykes, M., Tanaka, K., Rothstein, J.D., Maragakis, N.J. Loss of the astrocyte glutamate transporter GLT1 modifies disease in SOD1G93A mice. *Experimental Neurology* **201**, 120–130 (2006). DOI: 10.1016/j.expneurol.2006.03.028
- Parone, P.A., Da Cruz, S., Han, J.S., McAlonis-Downes, M., Vetto, A.P., Lee, S.K., Tseng, E., Cleveland, D.W. Enhancing Mitochondrial Calcium Buffering Capacity Reduces Aggregation of Misfolded SOD1 and Motor Neuron Cell Death without Extending Survival in Mouse Models of Inherited Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuroscience* **33**, 4657-4671 (2013). DOI: 10.1523/jneurosci.1119-12.2013
- Perlson, E., Jeong, G.-B., Ross, J.L., Dixit, R., Wallace, K.E., Kalb, R.G., Holzbaur, E.L.F. A Switch in Retrograde Signaling from Survival to Stress in Rapid-Onset Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience* **29**, 9903-9917 (2009). DOI: 10.1523/jneurosci.0813-09.2009
- Philips, T., Robberecht, W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurology* **10**(2011). DOI: 10.1016/S1474-4422(11)70015-1
- Philips, T., Rothstein, J.D. Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current Protocols in Pharmacology* **69**(2015). DOI: 10.1002/0471141755.ph0567s69
- Phillips, M., Pozzo-Miller, L. Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders. *Neuroscience Letters* **601**, 30-40 (2015). DOI: 10.1016/j.neulet.2015.01.011
- Pieri, M., Carunchio, I., Curcio, L., Mercuri, N.B., Zona, C. Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology* **215**, 368–379 (2009). DOI: 10.1016/j.expneurol.2008.11.002
- Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C., Hutt, K.R., Bennett, C.F., Cleveland, D.W., Yeo, G.W. Misregulated RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research* **1462**, 3-15 (2012). DOI: 10.1016/j.brainres.2012.02.059
- Raveendra, B.L., Siemer, A.B., Puthanveetil, S.V., Hendrickson, W.A., Kandel, E.R., Mcdermott, A.E. Characterization of prion-like conformational changes of the neuronal isoform of Aplysia CPEB. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**, 495-501 (2013). DOI: 10.1038/nsmb.2503
- Raynor, E.M., Shefner, J.M. Recurrent inhibition is decreased in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **44**, 2148-2153 (1994). DOI: 10.1212/wnl.44.11.2148
- Renton, A.E., Chiò, A., Traynor, B.J. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature Neuroscience* **17**, 17-23 (2014). DOI: 10.1038/nn.3584
- Rettig, J. Sensomotorik. in: Behrends, J., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C., Wischmeyer, E. Hrsg. *Duale Reihe Physiologie. 4. unveränderte Auflage* (Thieme, Stuttgart, 2021).
- Riedemann, T., Schmitz, C., Sutor, B. Immunocytochemical heterogeneity of somatostatin-expressing GABAergic interneurons in layers II and III of the mouse cingulate cortex: A combined

- immunofluorescence/design-based stereologic study. *PLOS ONE* **524**, 2281-2299 (2015). DOI: 10.1002/cne.23948
- Riedemann, T., Straub, T., Sutor, B. Two types of somatostatin-expressing GABAergic interneurons in the superficial layers of the mouse cingulate cortex. *PLOS ONE* **13**, e0200567 (2018). DOI: 10.1371/journal.pone.0200567
- 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., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S.M., Berger, R., Tanzi, R.E., Halperin, J.J., Herzfeldt, B., Van Den Bergh, R., Hung, W.-Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D.W., Smyth, C., Laing, N.G., Soriano, E., Pericak-Vance, M.A., Haines, J., Rouleau, G.A., Gusella, J.S., Horvitz, H.R., Brown, R.H. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62 (1993). DOI: 10.1038/362059a0
- Roth, B.L. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* **89**, 683-694 (2016). DOI: 10.1016/j.neuron.2016.01.040
- Rothstein, J.D., Tsai, G., Kuncl, R.W., Clawson, L., Cornblath, D.R., Drachman, D.B., Pestronk, A., Stauch, B.L., Coyle, J.T. Abnormal Excitatory Amino Acid Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol* **28**, 18-25 (1990). DOI: 10.1002/ana.410280106
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., Kuncl, R.W. Selective Loss of Glial Glutamate Transporter GLT-1 in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol* **38**, 73-84 (1995). DOI: 10.1002/ana.410380114
- Saba, L., Viscomi, M.T., Caioli, S., Pignataro, A., Bisicchia, E., Pieri, M., Molinari, M., Ammassari-Teule, M., Zona, C. Altered Functionality, Morphology, and Vesicular Glutamate Transporter Expression of Cortical Motor Neurons from a Presymptomatic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cerebral Cortex* **26**, 1512-1528 (2016). DOI: 10.1093/cercor/bhu317
- Sala, C., Segal, M. Dendritic Spines: The locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev* **94**, 141-188 (2014). DOI: 10.1152/physrev.00012.2013
- Sanderson, M.J., Smith, I., Parker, I., Bootman, M.D. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols* **2014**, pdb.top071795-p (2014). DOI: 10.1101/pdb.top071795
- Satin, A., Zachary, Bayat, E. ALS-Like Disorder in Three HIV-Positive Patients: Case Series. *Case Reports in Neurology* **13**, 59-64 (2021). DOI: 10.1159/000511203
- Saxena, S., Cabuy, E., Caroni, P. A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nature Neuroscience* **12**, 627-636 (2009). DOI: 10.1038/nn.2297
- Scekic-Zahirovic, J., Benetton, C., Brunet, A., Ye, X., Logunov, E., Douchamps, V., Megat, S., Andry, V., Kan, V.W.Y., Stuart-Lopez, G., Gilet, J., Guillot, S.J., Dirrig-Grosch, S., Gorin, C., Trombini, M., Dieterle, S., Sinniger, J., Fischer, M., René, F., Gunes, Z., Kessler, P., Dupuis, L., Pradat, P.-F., Goumon, Y., Goutagny, R., Marchand-Pauvert, V., Liebscher, S., Rouaux, C. Cortical hyperexcitability in mouse models and patients with amyotrophic lateral sclerosis is linked to noradrenaline deficiency. *Science Translational Medicine* **16**, eadg3665 (2024). DOI: 10.1126/scitranslmed.adg3665
- Scekic-Zahirovic, J., Sanjuan-Ruiz, I., Kan, V., Megat, S., De Rossi, P., Dieterlé, S., Cassel, R., Jamet, M., Kessler, P., Wiesner, D., Tzeplaeff, L., Demais, V., Sahadevan, S., Hembach, K.M., Muller, H.-P., Picchiarelli, G., Mishra, N., Antonucci, S., Dirrig-Grosch, S., Kassubek, J., Rasche, V., Ludolph, A., Boutilier, A.-L., Roselli, F., Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C., Liebscher, S., Dupuis, L. Cytoplasmic FUS triggers early behavioral alterations linked to cortical neuronal hyperactivity and inhibitory synaptic defects. *Nature Communications* **12**(2021). DOI: 10.1038/s41467-021-23187-9
- Schmid, L.C., Mittag, M., Poll, S., Steffen, J., Wagner, J., Geis, H.-R., Schwarz, I., Schmidt, B., Martin, Remy, S., Fuhrmann, M. Dysfunction of Somatostatin-Positive Interneurons Associated with Memory Deficits in an Alzheimer's Disease Model. *Neuron* **92**, 114-125 (2016). DOI: 10.1016/j.neuron.2016.08.034
- Shepherd, G.M.G. Corticoatrial connectivity and its role in disease. *Nature Reviews Neuroscience* **14**, 278-291 (2013). DOI: 10.1038/nrn3469
- Shibuya, K., Misawa, S., Arai, K., Nakata, M., Kanai, K., Yoshiyama, Y., Ito, K., Iose, S., Noto, Y.-i., Nasu, S., Sekiguchi, Y., Fujimaki, Y., Ohmori, S., Kitamura, H., Sato, Y., Kuwabara, S. Markedly reduced axonal potassium channel expression in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis: An immunohistochemical study. *Experimental Neurology* **232**, 149-153 (2011). DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.08.015

- Shibuya, K., Simon, N.G., Geevasinga, N., Menon, P., Howells, J., Park, S.B., Huynh, W., Noto, Y.-i., Vucic, S., Kiernan, M.C. The evolution of motor cortical dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neurophysiology* (2017). DOI: 10.1016/j.clinph.2017.03.004
- Smith, S.E., McCoy-Gross, K., Malcolm, A., Oranski, J., Markway, J.W., Miller, T.M., Bucelli, R.C. Tofersen treatment leads to sustained stabilization of disease in SOD1 ALS in a “real-world” setting. *Annals of Clinical and Translational Neurology* (2025). DOI: 10.1002/acn3.52264
- So, P.T.C., Dong, C.Y., Masters, B.R., Berland, K.M. Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2**, 399-429 (2000). DOI: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.399
- Soueid, J., Nokkari, A., Makoukji, J. Techniques and Methods of Animal Brain Surgery: Perfusion, Brain Removal, and Histological Techniques. *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects Chapter 15*(2015).
- Spalloni, A., Origlia, N., Sgobio, C., Trabalza, A., Nutini, M., Berretta, N., Bernardi, G., Domenici, L., Ammassari-Teule, M., Longone, P. Postsynaptic Alteration of NR2A Subunit and Defective Autophosphorylation of alphaCaMKII at Threonine-286 Contribute to Abnormal Plasticity and Morphology of Upper Motor Neurons in Presymptomatic SOD1G93A Mice, a Murine Model for Amyotrophic Lateral Scler. *Cerebral Cortex* **21**, 796-805 (2011). DOI: 10.1093/cercor/bhq152
- Steffens, H., Mott, A.C., Li, S., Wegner, W., Švehla, P., Kan, V.W.Y., Wolf, F., Liebscher, S., Willig, K.I. Stable but not rigid: Chronic in vivo STED nanoscopy reveals extensive remodeling of spines, indicating multiple drivers of plasticity. *Sci.Adv.* **7**, eabf2806 (2021).
- Suha, Y.H., Chang, K., Roche, K.W. Metabotropic glutamate receptor trafficking. *Mol Cell Neurosci* **91**, 10-24 (2018). DOI: 10.1016/j.mcn.2018.03.014
- Sunico, C.R., Domínguez, G., García-Verdugo, J.M., Osta, R., Montero, F., Moreno-López, B. Reduction in the Motoneuron Inhibitory/Excitatory Synaptic Ratio in an Early-Symptomatic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Pathology* **21**, 1-15 (2011). DOI: 10.1111/j.1750-3639.2010.00417.x
- Suter, B.A., Shepherd, G.M.G. Reciprocal Interareal Connections to Corticospinal Neurons in Mouse M1 and S2. *The Journal of Neuroscience* **35**, 2959-2974 (2015). DOI: 10.1523/jneurosci.4287-14.2015
- Swanson, O.K., Maffei, A. From Hiring to Firing: Activation of Inhibitory Neurons and Their Recruitment in Behavior. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **12**, 168 (2019). DOI: 10.3389/fnmol.2019.00168
- Trachtenberg, J.T., Chen, B.E., Knott, G.W., Feng, G., Sanes, J.R., Welker, E., Svoboda, K. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* **420**, 788-794 (2002). DOI: 10.1038/nature01273
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* **62**, 405–496 (2010).
- Tremblay, R., Lee, S., Rudy, B. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* **91**, 260-292 (2016). DOI: 10.1016/j.neuron.2016.06.033
- Tyzack, G.E., Luisier, R., Taha, D.M., Neeves, J., Modic, M., Mitchell, J.S., Meyer, I., Greensmith, L., Newcombe, J., Ule, J., Luscombe, N.M., Patani, R. Widespread FUS mislocalization is a molecular hallmark of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **142**, 2572–2580 (2019). DOI: 10.1093/brain/awz217
- Uchida, A., Sasaguri, H., Kimura, N., Tajiri, M., Ohkubo, T., Ono, F., Sakaue, F., Kanai, K., Hirai, T., Sano, T., Shibuya, K., Kobayashi, M., Yamamoto, M., Yokota, S., Kubodera, T., Tomori, M., Sakaki, K., Enomoto, M., Hirai, Y., Kumagai, J., Yasutomi, Y., Mochizuki, H., Kuwabara, S., Uchiyama, T., Mizusawa, H., Yokota, T. Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain* **135**, 833–846 (2012). DOI: 10.1093/brain/awr348
- Udaka, F., Kameyama, M., Tomonaga, M. Degeneration of Betz Cells in Motor Neuron Disease. A Golgi Study. *Acta Neuropathologica* **70**, 289-295 (1986). DOI: 10.1007/BF00686086
- Ueno, M., Nakamura, Y., Li, J., Gu, Z., Niehaus, J., Maezawa, M., Crone, S.A., Goulding, M., Baccei, M.L., Yoshida, Y. Corticospinal Circuits from the Sensory and Motor Cortices Differentially Regulate Skilled Movements through Distinct Spinal Interneurons. *Cell Rep.* **23**, 1286–1300 (2018). DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.137
- Van Damme, P., Bogaert, E., Dewil, M., Hersmus, N., Kiraly, D., Scheveneels, W., Bockx, I., Braeken, D., Verpoorten, N., Verhoeven, K., Timmerman, V., Herijgers, P., Callewaert, G., Carmeliet, P., Van Den Bosch, L., Robberecht, W. Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and

- their vulnerability to excitotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 14825-14830 (2007). DOI: 10.1073/pnas.0705046104
- Van Den Bos, M.A.J., Higashihara, M., Geevasinga, N., Menon, P., Kiernan, M.C., Vucic, S. Imbalance of cortical facilitatory and inhibitory circuits underlies hyperexcitability in ALS. *Neurology* **91**, e1669-e1676 (2018). DOI: 10.1212/wnl.0000000000006438
- Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E., Robberecht, W. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1762**, 1068–1082 (2006). DOI: 10.1016/j.bbadis.2006.05.002
- Vieira, F.G., Ladow, E., Moreno, A., Kidd, J.D., Levine, B., Thompson, K., Gill, A., Finkbeiner, S., Perrin, S. Dexamipexole Is Ineffective in Two Models of ALS Related Neurodegeneration. *PLoS ONE* **9**, e91608 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0091608
- Villalba, R.M., Smith, Y. Striatal spine plasticity in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy* **4**, 133 (2010). DOI: 10.3389/fnana.2010.00133
- Vu, E.T., Krasne, F.B. Evidence for a Computational Distinction Between Proximal and Distal Neuronal Inhibition. *Science* **255**, 1710-1712 (1992).
- Vucic, S., Kiernan, M.C. Upregulation of persistent sodium conductances in familial ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **81**, 222-227 (2010). DOI: 10.1136/jnnp.2009.183079
- Wang, L., Gutmann, D.H., Roos, R.P. Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Human Molecular Genetics* **20**, 286-293 (2011). DOI: 10.1093/hmg/ddq463
- Wang, X.-S., Simmons, Z., Liu, W., Boyer, P.J., Connor, J.R. Differential expression of genes in amyotrophic lateral sclerosis revealed by profiling the post mortem cortex. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* **7**, 201-216 (2006). DOI: 10.1080/17482960600947689
- Webster, C.P., Smith, E.F., Bauer, C.S., Moller, A., Hautbergue, G.M., Ferraiuolo, L., Myszczyńska, M.A., Higginbottom, A., Walsh, M.J., Whitworth, A.J., Kaspar, B.K., Meyer, K., Shaw, P.J., Grierson, A.J., De Vos, K.J. The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK1 complex to regulate initiation of autophagy. *The EMBO Journal* **35**, 1656-1676 (2016). DOI: 10.15252/embj.201694401
- Weydt, P., Hong, S., Kliot, M., Möller, T. Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. **14**, 1051-1054 (2003). DOI: 10.1097/01.wnr.0000073685.00308.89
- Whitehouse, P.J., Wamsley, J.K., Zarbin, M.A., Price, D.L., Tourtellotte, W.W., Kuhar, M.J. Amyotrophic lateral sclerosis: alterations in neurotransmitter receptors. *Ann Neurol* **14**, 8-16 (1983). DOI: 10.1002/ana.410140103
- Williamson, T.L., Cleveland, D.W. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nature Neuroscience* **2**, 50-56 (1999). DOI: 10.1038/4553
- Wu, J.W., Herman, M., Liu, L., Simoes, S., Acker, C.M., Figueroa, H., Steinberg, J.I., Margittai, M., Kaye, R., Zurzolo, C., Di Paolo, G., Duff, K.E. Small Misfolded Tau Species Are Internalized via Bulk Endocytosis and Anterogradely and Retrogradely Transported in Neurons. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 1856-1870 (2013). DOI: 10.1074/jbc.m112.394528
- Wu, S.J., Sevier, E., Dwivedi, D., Saldi, G.-A., Hairston, A., Yu, S., Abbott, L., Choi, D.H., Sherer, M., Qiu, Y., Shinde, A., Lenahan, M., Rizzo, D., Xu, Q., Barrera, I., Kumar, V., Marrero, G., Prönnke, A., Huang, S., Kullander, K., Stafford, D.A., Macosko, E., Chen, F., Rudy, B., Fishell, G. Cortical somatostatin interneuron subtypes form cell-type specific circuits. *Neuron* **111**, 1675-2692 (2023). DOI: 10.1016/j.neuron.2023.05.032
- Xu, T., Yu, X., Perlik, A.J., Tobin, W.F., Zweig, J.A., Tennant, K., Jones, T., Zuo, Y. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature* **462**, 915-919 (2009). DOI: 10.1038/nature08389
- Xue, Y.C., Feuer, R., Cashman, N., Luo, H. Enteroviral Infection: The Forgotten Link to Amyotrophic Lateral Sclerosis? *Front. Mol. Neurosci* **11**, 63 (2018). DOI: 10.3389/fnmol.2018.00063
- Yamanaka, K., Boillee, S., Roberts, E.A., Garcia, M.L., McAlonis-Downes, M., Mikse, O.R., Cleveland, D.W., Goldstein, L.S.B. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 7594-7599 (2008). DOI: 10.1073/pnas.0802556105
- Zhang, W., Zhang, L., Liang, B., Schroeder, D., Zhang, Z.-W., Cox, G.A., Li, Y., Lin, D.-T. Hyperactive somatostatin interneurons contribute to excitotoxicity in neurodegenerative disorders. *Nature Neuroscience* **19**, 557-559 (2016). DOI: 10.1038/nn.4257
- Zhou, Q., Homma, K.J., Poo, M.-M. Shrinkage of Dendritic Spines Associated with Long-Term Depression of Hippocampal Synapses. *Neuron* **44**, 749-757 (2004). DOI: 10.1016/j.neuron.2004.11.011

- Zhu, S., Stavrovskaya, I.G., Drozda, M., Kim, B.Y.S., Ona, V., Li, M., Sarang, S., Liu, A.S., Hartley, D.M., Wuk, D.C., Gullans, S., Ferrante, R.J., Przedborski, S., Kristal, B.S., Friedlander, R.M. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* **417**, 74-78 (2002). DOI: 10.1038/417074a
- Zou, Z.-Y., Zhou, Z.-R., Che, C.-H., Liu, C.-Y., He, R.-L., Huang, H.-P. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **0**, 1-10 (2017). DOI: 10.1136/jnnp2016-315018
- Zu, T., Gibbens, B., Doty, N.S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M.D., Margolis, J., Peterson, M., Markowski, T.W., Ingram, M.A.C., Nan, Z., Forster, C., Low, W.C., Schoser, B., Somia, N.V., Clark, H.B., Schmechel, S., Bitterman, P.B., Gourdon, G., Swanson, M.S., Moseley, M., Ranum, L.P.W. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 260-265 (2011). DOI: 10.1073/pnas.1013343108
- Zuo, Y., Lin, A., Chang, P., Gan, W.-B. Development of Long-Term Dendritic Spine Stability in Diverse Regions of Cerebral Cortex. *Neuron* **46**, 181-189 (2005a). DOI: 10.1016/j.neuron.2005.04.001
- Zuo, Y., Yang, G., Kwon, E., Gan, W.-B. Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature* **436**, 261-265 (2005b). DOI: 10.1038/nature03715



Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Graf, Georg

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
**Analyse der strukturellen Plastizität von Interneuronen im motorischen Kortex
in einem Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Heide, 02.03.2025

Ort, Datum

Georg Graf

Unterschrift Georg Graf



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Name: Georg Graf

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel

Analyse der strukturellen Plastizität von Interneuronen im motorischen Kortex in einem Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Heide, 02.03.2025

Ort, Datum

Georg Graf

Unterschrift Georg Graf