

Aus dem Zentrum für Neurologie und Psychiatrie der Universität zu Köln

Klinik und Poliklinik für Neurologie

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

**Auswirkungen einer peripheren Nervenverletzung auf  
benachbarte Nerven durch Mikrogliaakkumulation im  
Rückenmark von Wildtypmäusen und einem  
neurodegenerativen Mausmodell (SOD1<sup>G93A</sup>)**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Philip Thomas Röth

aus Bonn

promoviert am

17. November 2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Professor Dr. med. H. C. Lehmann

2. Professor Dr. med. D. N. Angelov

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Professor Dr. Helmar C. Lehmann,

Dr. nat. med. Ines Klein,

Dr. nat. med. Ilja Bobylev.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Projektplanung wurde durch Professor Dr. Helmar C. Lehmann initiiert. Die weitere Ausgestaltung und praktischen Arbeiten wurden von mir selbstständig durchgeführt. Hierbei wurde ich bei Rückfragen von Professor Dr. Helmar C. Lehmann, Dr. nat. med. Ines Klein und Dr. nat. med. Ilja Bobylev unterstützt. Die Operationen an den Versuchstieren, Messungen und Perforationen wurden zunächst mit Unterstützung durch Dr. nat. med. Ilja Bobylev durchgeführt, nach Genehmigung der Tierschutzbeauftragten wurden sie von mir selbstständig durchgeführt.

Die labortechnische Assistentin Frau Claudia Drapatz unterstütze mich bei der Anfertigung der Horizontalschnitte im Kryostaten.

Dr. nat. med. Ines Klein erklärte mir die Durchführung der histologischen Aufarbeitung und Grundlagen der immunhistochemischen Färbungen. Nachfolgend führte ich alle weiteren Tätigkeiten selbstständig durch und etablierte die weiteren immunhistochemischen Färbungen in unserer Arbeitsgruppe.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 18.01.2022

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'P. V. H.' or similar, written in a cursive style.

## **Danksagung**

Zu Anfang möchte ich Herrn Prof. Dr. Helmar C. Lehmann dafür danken, dass er mich seit Beginn meines Forschungsprojektes unterstützte und mir täglich Freude und Begeisterung an wissenschaftlicher Forschung vermittelt hat. Durch seine vorausschauende Planung und Förderung war es mir möglich in dieser Arbeit meine Interessen einzubringen und Forschungen eigenständig zu gestalten.

Frau Dr. nat. med. Ines Klein möchte ich für die kontinuierliche Begleitung im Labor und bei meinen Experimenten bedanken. Ihre Begeisterung für praktische Tätigkeiten im Labor sprang schnell auf mich über und ich hatte viel Freude daran mich wissenschaftlich zu entfalten.

Gerade in der Anfangszeit meiner wissenschaftlichen Laufbahn hat mir Herr Dr. nat. med. Ilja Bobilev geholfen, vermeidbare Fehler zu umgehen und mit seiner Erfahrung meine Entwicklung geprägt.

Bei Frau Claudia Drapatz möchte ich mich für die Unterstützung bei den vielen Kleinigkeiten, die bestellt, besorgt und gesucht werden mussten, bedanken. Des Weiteren bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Anfertigung der Nervenschnitte.

Ich möchte mich bei den Mitarbeitern der AG Neuroinflammation und neuromuskuläre Erkrankungen für die angenehme Atmosphäre und die freundliche Unterstützung im Labor bedanken. Ich werde die Zeit immer in guter Erinnerung behalten.

Abschließend gilt besonderer Dank meiner Familie, meinen Freunden und meiner Partnerin für ihre persönliche Unterstützung und den Glauben in meine Fähigkeiten, der mir ein Ansporn war diese Arbeit mit so viel Begeisterung fortzuführen und nicht den Fokus zu verlieren.

**Für Eva und Rainer**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>10</b>
<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>14</b>
2.1 Amyotrophe Lateralsklerose.....	14
2.2 Das Tiermodell der ALS: SOD1 <sup>G93A</sup> .....	16
2.3 Makrophagen und Mikroglia .....	18
2.4 Polarisierung von Makrophagen.....	19
2.5 Rolle von Makrophagen und Mikroglia nach einer Nervenverletzung .....	21
2.6 Zielsetzung der Arbeit .....	24
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
3.1 Material.....	25
3.1.1 Chemikalien .....	25
3.1.2 Kits .....	26
3.1.3 Primer .....	26
3.1.4 Antikörper.....	26
3.1.5 Geräte.....	27
3.2 Tierhaltung und Versuchstiermodell .....	28
3.3 Genotypisierung.....	28
3.4 Polymerase - Kettenreaktion .....	29
3.5 Operation .....	30
3.5.1 Operationseinleitung.....	30
3.5.2 Elektroneurographie.....	31
3.5.3 Periphere Nervenverletzung .....	32
3.5.4 Tracerinjektion .....	33
3.6 Organasservierung .....	34
3.6.1 Perfusion.....	34

3.6.2 Gewebentnahme Rückenmark .....	34
3.6.3 Entnahme des Nervus tibialis .....	35
3.7 Immunhistochemie .....	35
3.7.1 Mikroglia .....	35
3.7.2 Immunhistochemie für M1/M2 polarisierte Mikroglia .....	36
3.7.3. Semidünnschnitte des N. tibialis .....	37
3.8 Auswertung .....	38
3.8.1 Mikrogliazählung .....	38
3.8.2 Nachweis des Tracers im Rückenmark .....	38
3.8.3 Quantifizierung von Axonen im N. tibialis .....	39
3.9 Schematischer Versuchsaufbau .....	41
3.10 Statistische Analyse .....	41
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
4.1 Mikroglia im Rückenmark in Wildtyp- und SOD1 <sub>G93A</sub> Mäusen .....	43
4.2 Mikroglia im Rückenmark von Wildtypmäusen nach Nervenverletzung .....	44
4.3 Mikroglia im Rückenmark von präsymptomatischen SOD1 <sub>G93A</sub> Mäusen nach Nervenverletzung .....	45
4.4 Mikroglia im Rückenmark von symptomatischen SOD1 <sub>G93A</sub> Mäusen nach Nervenverletzung .....	46
4.5 Symptomatische SOD1 <sub>G93A</sub> Mäuse mit verringerter Mikrogliaakkumulation .....	47
4.6 Immunhistochemische Untersuchungen der Polarisierung von Mikroglia .....	48
4.7 Ergebnisse der Tracer-Experimente .....	50
4.8 Quantifizierung der Mikroglia um die Perikarya des N. tibialis .....	50
4.9 Mikrogliaakkumulation um die Motoneurone des N. tibialis nach Verletzung des N. peroneus .....	52
4.10 Mikrogliaakkumulation um die Motoneurone des N. tibialis symptomatischer SOD1 <sub>G93A</sub> Mäuse nach Verletzung des N. peroneus .....	54
4.11 Ergebnisse der Elektroneurographie .....	55

4.12 Neurographie des N. tibialis sieben Tage nach Läsion des N. peroneus .....	57
4.13 Quantifizierung der Axone des N. tibialis vor Intervention .....	58
4.14 Quantifizierung der Axone des N. tibialis nach Verletzung des N. peroneus .....	58
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>60</b>
5.1. Mikrogliaakkumulation im Rückenmark nach einer peripheren Nervenverletzung des N. peroneus.....	60
5.2 Mikrogliaakkumulation im Rückenmark präsymptomatischer und symptomatischer SOD1 <sup>G93A</sup> Mäuse .....	62
5.3 Präsymptomatische SOD1 <sup>G93A</sup> Mäuse mit erhöhter Mikrogliaakkumulation nach Nervenverletzung.....	63
5.4 Polarisierung von Mikroglia .....	64
5.5 Elektrophysiologische Untersuchungen .....	65
5.6 Die Nervenverletzung führt zu einer axonalen Degeneration des N. tibialis von Wildtypmäusen, allerdings nicht von SOD1 <sup>G93A</sup> Mäusen .....	66
5.7 Methodische Limitierung .....	68
5.8 Zukunftsperspektiven .....	69
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>89</b>
7.1 Abbildungsverzeichnis .....	89
7.2 Tabellenverzeichnis .....	90

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleic acid
<b>DRG</b>	Spinalganglion (dorsal root ganglia)
<b>h</b>	Stunde
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>mA</b>	Milliampere
<b>min.</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Mikromolar
<b>MSAP</b>	Muskelsummenaktionspotential
<b>mV</b>	Millivolt
<b>M.</b>	Muskulus
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>n=</b>	number (Anzahl)
<b>N.</b>	Nervus
<b>Nn.</b>	Nervi
<b>n.s.</b>	Nicht signifikant
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>ROI</b>	Interessensregion (Region of interest)
<b>rpm</b>	Rounds per minute
<b>sek.</b>	Sekunde

<b>SEM</b>	Mittlerer Standardfehler (Standard error of the mean)
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>UV</b>	Ultraviolettstrahlung
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem
<b>μl</b>	Mikroliter
<b>μm</b>	Mikrometer

# 1. Zusammenfassung

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine Erkrankung der motorischen Nerven des zentralen und peripheren Nervensystems. Es kommt hierdurch zu einem fortschreitenden Funktionsverlust, der klinisch zu Paresen der Zielmuskulatur führt. Die Ätiologie der Erkrankung ist unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Mikroglia, das heißt gewebständigen Makrophagen im Rückenmark, auf die Pathogenese der ALS untersucht. Nach peripherer Nervenverletzung kommt es im Rückenmark auch unter physiologischen Bedingungen zu einer Akkumulation von Mikroglia um die betroffenen Motoneurone. Es ist vorstellbar, dass diese Mikroglie insbesondere bei der ALS einen Einfluss auf die Funktion benachbarter Motoneurone haben könnte. Wir verglichen deshalb sieben Tage nach Verletzung des N. peroneus Rückenmarksschnitte von Wildtypmäusen (C57BL/6) mit denen von transgenen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen. Es handelt sich um ein etabliertes Mausmodell der ALS. Dabei unterschieden wir präsymptomatische SOD1<sup>G93A</sup> und symptomatische SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse. Mittels Immunhistochemie wurden die Mikroglia im Rückenmark markiert. Um die Mikroglie um die Motoneurone des benachbarten unverletzten N. tibialis zu identifizieren, wurde ein Tracer in den Zielmuskel (M. gastrocnemius) injiziert, welcher mittels retrogradem axonalem Transport Motoneurone im Rückenmark markierte. Außerdem analysierte ich Polarisierungen in inflammatorische M1 Mikroglia und antiinflammatorische M2 Mikroglia. Um die Auswirkungen der Mikroglia auf die Funktion der Motoneurone zu untersuchen, wurden zudem elektroneurographische und morphometrische Messungen des N. tibialis vor und sieben Tage nach der Operation durchgeführt.

Die periphere Nervenverletzung führte zu einer Mikrogliaakkumulation im Rückenmark sowohl bei Wildtypmäusen als auch bei präsymptomatischen und symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen. Diese zeigte sich besonders ausgeprägt im präsymptomatischen Stadium und war signifikant höher im Vergleich zu symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen. Es konnten jedoch keine Polarisierungen von Mikroglia in M1/M2 nachgewiesen werden. Um die Motoneurone des unverletzten N. tibialis zeigte sich bei Wildtypmäusen und präsymptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen eine signifikant höhere Anzahl an Mikroglia ipsilateral der Läsion im Vergleich zur kontralateralen Seite. Die weniger ausgeprägte Zahl von Mikroglia nach peripherer Nervenverletzung bei symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen und die fehlende Erhöhung von Mikroglia ipsilateral um die Motoneurone des

N. tibialis könnten sich durch die krankheitsbedingt erhöhte Mikrogliazahl erklären lassen, welche bei Kontrolltieren signifikant nachgewiesen wurde.

In keiner der drei Versuchsgruppen zeigte sich elektroneurographisch ein Unterschied der Muskelsummenaktionspotentiale des N. tibialis vor und sieben Tage nach Operation. In der Morphometrie zeigten Wildtypmäuse jedoch eine signifikant geringere Axonzahl des N. tibialis ipsilateral der Läsion. Bei präsymptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> und symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen zeigte sich dies nicht. Kontrolltiere symptomatischer SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse wiesen sowohl ein signifikant geringeres Muskelsummenaktionspotential als auch eine geringere Axonzahl im Vergleich zu Wildtypmäusen auf, was ein Korrelat der fortschreitenden Neurodegeneration sein könnte.

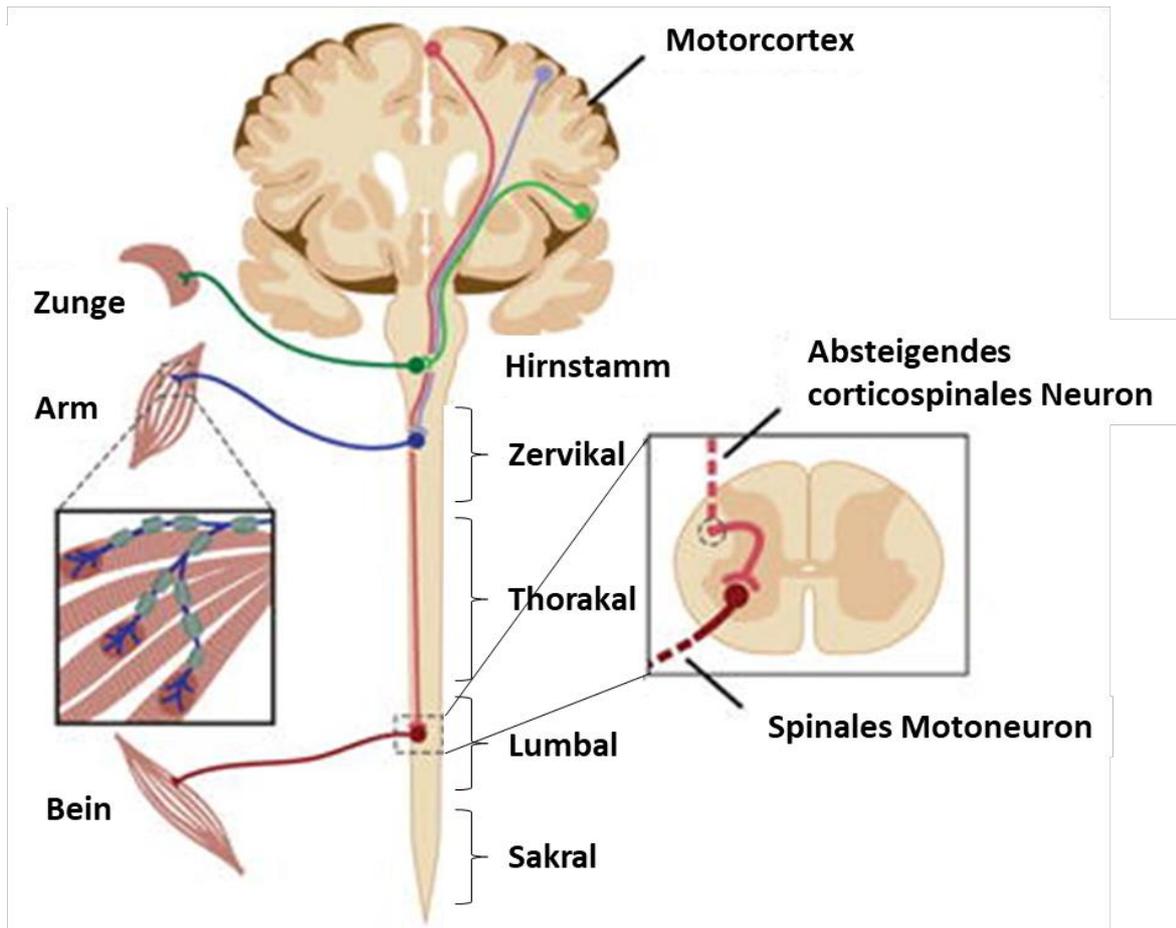
Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Mikrogliaakkumulation nach peripherer Nervenverletzung nicht nur auf Motoneurone des betroffenen Nervs beschränkt ist, sondern auch die Funktion unverletzter benachbarter Motoneurone beeinträchtigen kann. Diese Mikrogliose tritt bei Wildtypmäusen und einem Mausmodell der ALS auf. Dabei zeigten sich auch in den peripheren Nerven degenerative Effekte. Es sind jedoch weitere Studien notwendig, um die genaue Funktion und Konsequenz der Mikrogliose nach Nervenverletzung und in der ALS zu erforschen.

## 2. Einleitung

### 2.1 Amyotrophe Lateralsklerose

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine Multisystemerkrankung, die durch einen schnell fortschreitenden neurodegenerativen Prozess gekennzeichnet ist. Es kommt zu einem Absterben der Nervenzellen, welche Muskeln innervieren. Diese Degeneration der Motoneurone findet im Motorcortex, Hirnstamm und Rückenmark statt (siehe **Abb. 1**) (Kirby et al., 2016; Taylor et al., 2016; Ghatak et al., 1986). Dabei gibt es große individuelle Unterschiede in Bezug auf die Region und die Progression der Krankheit. Es sind sowohl die zentralen Motoneurone im Motorkortex (siehe **Abb. 1**) als auch die peripheren Motoneurone im Hirnstamm und Rückenmark betroffen. Abhängig von der betroffenen Körperregion und der Involvierung anderer Systeme wie Kognition und Verhalten ist die Erkrankung unterschiedlich ausgeprägt (Ravits & La Spada, 2009).

Primär führt die Neurodegeneration zu einer nachlassenden Funktion der Muskulatur die für die Sprachbildung zuständig sind (Bulbärsymptomatik) und zu Lähmungen der Extremitäten (Paresen). Diese Paresen schreiten zunehmend voran. In der Folge kommt es zu Problemen den Körper aufrecht zu halten, zu erschwertem Schlucken und Atmen. Unumkehrbar verschlechtert sich der Zustand und führt mit der Zeit durch Atemversagen zum Tod (Gibbons et al., 2018; Hardiman et al., 2011).



**Abbildung 1 Degenerationsprozess der ALS**

Degeneration der zentralen (Motorkortex) und peripheren spinalen Motoneurone (Hirnstamm und zervikales bis sakrales Rückenmark) führt zu Paresen der innervierten Muskeln.

Bild übernommen und modifiziert aus "Decoding ALS: From Genes to Mechanism" (Taylor et al., 2016).

Die Ursache der Krankheit ist auch 140 Jahre nach der ersten Beschreibung weitestgehend ungeklärt (Al-Chalabi & Tripathi, 2008). Die ALS hat eine Prävalenz von 3-5/100.000 pro Jahr in den westlichen Ländern (Chiò et al., 2013) und ist damit die häufigste Motoneuronenerkrankung im Erwachsenenalter (Renton et al., 2014).

Die mittlere Überlebenszeit nach der Diagnose, meist im 50.- 65. Lebensjahr, beträgt drei bis fünf Jahre (Zarei et al., 2015). Es gibt keine Heilung für die ALS. Das wirksamste Medikament, Riluzol, verlängert das Überleben von Patienten im Mittel um nur ca. zwei bis drei Monate (Miller et al., 2012). Riluzol wirkt über eine Hemmung der Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat (Martin et al., 1993). Weitere Therapieansätze, wie antioxidative und antiinflammatorische Medikamente, sind in Erprobung, konnten aber bisher keine eindeutigen Effekte zeigen (Cozzolino & Carri, 2012).

Daneben gibt es symptomatische Therapien gegen Schluckstörungen und Gewichtsabnahme mit einer perkutanen endoskopischen Gastrostomie (PEG). Das Medikament Baclofen hilft häufig nur begrenzt gegen Spastiken und ist eher als Therapieversuch zu sehen. Dazu unterstützen logotherapeutische und ergotherapeutische Behandlungen individuelle Lösungen zur Kompensation eingeschränkter Funktionen zu finden (Hobson & McDermott, 2016).

Ungefähr 10% der ALS-Fälle sind genetisch determiniert, wobei 60% - 70% dieser Mutationen autosomal dominant vererbt werden (Haverkamp et al., 1995). Klinisch sind hier häufig ganze Familien betroffen (hereditäre ALS). Neunzig Prozent aller ALS-Fälle treten jedoch sporadisch auf (Rowland & Shneider, 2001).

Eine der häufigsten Mutationen bei hereditärer ALS ist eine Mutation des Kupfer/Zink Superoxid Dismutase 1 (SOD1) Gens (Renton et al., 2014; Rosen et al., 1993). Sie liegt bei ca. 12% der familiären Fälle und ca. 1% der sporadischen Fälle vor (Chio et al., 2008). Die Mutation führt bei der familiären Form zu einem elf Jahre früheren Krankheitsausbruch (Andersen, 2006). Außerdem sind weitere Mutationen wie eine exzessive Nukleotidwiederholung im C9orf72 Gen, ein Defekt des „TAR DNA binding protein“ (TARBD) oder Mutationen des DNA/RNA-Bindungsproteins „fused in sarcoma“ (FUS) beschrieben (Fazal et al., 2021; Siddique & Siddique, 2021; Tsai et al., 2020).

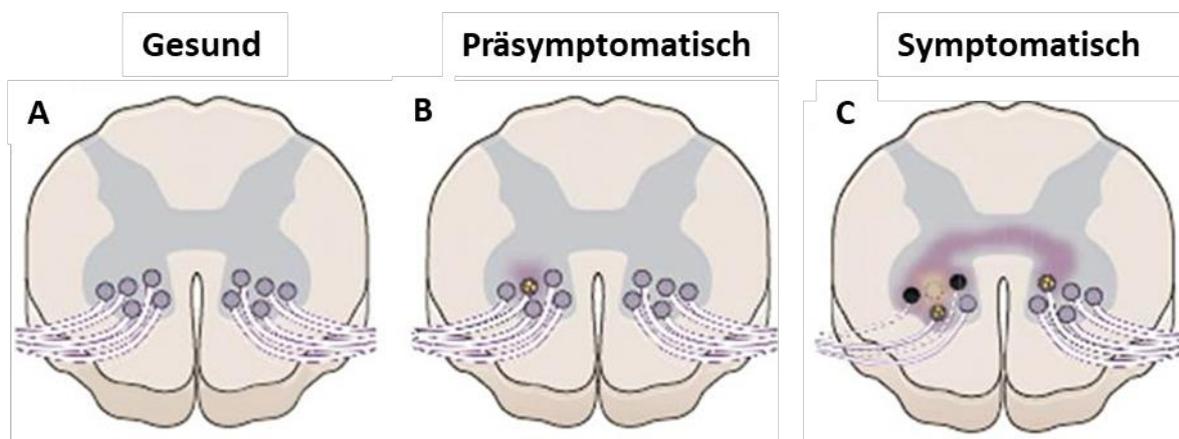
## **2.2 Das Tiermodell der ALS: SOD1<sup>G93A</sup>**

In normaler Funktion, als antioxidatives Enzym, detoxifiziert die Superoxiddismutase 1 (SOD1) Superoxide ( $O_2^-$ ). Dabei wandelt es zwei dieser Superoxide in  $H_2O_2$  und  $O_2$  um. Zwei  $H_2O_2$  zerfallen spontan in Wasser und Sauerstoff (McCord & Fridovich, 1969).

Der Schaden für die Nervenzelle durch das mutierte Enzym ist noch nicht abschließend geklärt. Er entsteht wahrscheinlich durch eine Überfunktion der SOD1 (Hayashi et al., 2016; Borchelt et al., 1994). Eine Theorie ist, dass es hierbei über eine für die Nervenzelle toxische Aggregation von Proteinen zum Untergang der Motoneurone kommt (Münch & Bertolotti, 2010; Watanabe et al., 2001). Andere postulierte Schädigungsmechanismen der SOD1 sind eine Dysfunktion von Mitochondrien und die Induktion eines defizitären axonalen Transports (Hayashi et al., 2016).

In den letzten 20 Jahren wurden verschiedene transgene Mausmodelle entwickelt, welche eine Mutation der SOD1 besitzen. Diese werden für die Erforschung des Krankheitsmechanismus und potentieller therapeutischer Strategien der ALS eingesetzt (Perrin, 2014; Gurney et al., 1994). Die toxische Überfunktion der SOD1 führt auch im Mausmodell zu Paresen und dem frühzeitigen Tod durch Atemversagen (Okado-Matsumoto et al., 2002).

Das am häufigsten verwendete Tiermodell ist hierbei die SOD1<sup>G93A</sup> Maus, bei der ein mutiertes Gen eingefügt wurde, welches zu einer Motoneurondegeneration ähnlich der ALS führt. Bei diesen transgenen Mäusen kommt es ab Tag 35-45 zu ersten Veränderungen, wie Denervierungen der motorischen Endplatten und einer Akkumulation von Mitochondrien in Neuronen. Dieses ist das präsymptomatische Stadium (**Abb. 2 B**). Erst ab Tag 80-90 zeigen sich erste Symptome, wie ein beginnender Tremor. Erste Motoneurone sterben ab. Am Tag 100 sind ca. 50% der Motoneurone untergegangen (**Abb. 2 C**). In der Endphase der Krankheit, um den 130. -140. Lebensstag, ist die Maus gelähmt und stirbt (Fischer et al., 2004; Hall, et al., 1998; Chiu et al., 1995).



### Abbildung 2 Motoneurondegeneration im Rückenmark

Skizze eines Rückenmarksschnitts der Maus. Alle Motoneurone sind ohne Beeinträchtigung (A). Im präsymptomatischen Stadium kommt es zu einem Untergang einzelner Motoneurone. Dies führt aber noch nicht zu einer klinisch sichtbaren Lähmung (B). In Abbildung C ist zu erkennen, dass sich die Inflammation und Neurotoxizität ausbreitet. Die von Region zu Region fortschreitende Degeneration führt zur Zerstörung der Motoneurone und entsprechender Klinik.

Bild übernommen und modifiziert aus "Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)." (Grad et al., 2017)

## 2.3 Makrophagen und Mikroglia

Als initiale Antwort des Immunsystems bei einer Infektion oder Erkrankung verfügt der Körper unter anderem über im Blutkreislauf zirkulierende und spezialisierte, gewebsständige Abwehrzellen, die Makrophagen (Lameijer et al., 2013; Wynn et al., 2008). Diese Makrophagen sind mit einer weiten Spanne von Rezeptoren (pathogen recognition receptors) ausgestattet, welche sie hoch effizient in der Phagozytose, dem „Fressen“ von Pathogenen, werden lassen (Gordon, 2002). Als antigenpräsentierende Zellen haben sie zudem eine Schlüsselrolle in der Transduktion von Alarmsignalen und als Konsequenz in der Bildung von Gedächtniszellen (Iijima & Iwasaki, 2014). Ihr Ziel ist es, durch das Abräumen von apoptotischen Zellen und Zelltrümmern, die Homöostase wiederherzustellen (Lucas et al., 2010). Des Weiteren spielen Makrophagen bei komplexeren Vorgängen, wie Fibrosierung und Regeneration von Geweben, eine Rolle (Wynn et al., 2013).

Spezialisierte gewebsständige Makrophagen werden nach Lokalisation und Funktion in Subtypen unterteilt: Osteoklasten im Knochen, Histozyten in der Milz, Kupferzellen in der Leber und Mikroglia im zentralen Nervensystem (ZNS) (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Mikroglia sind hämatopoetischen Ursprungs und siedeln sich schon in der frühen Entwicklungsphase im ZNS an (Ransohoff & Perry, 2009; McKercher et al., 1996). Sie sind für die Homöostase des ZNS zuständig, indem sie Zelltrümmer phagozytieren (Neumann et al., 2009). Ihre Zahl wird aus im Blut zirkulierenden Monozyten aufgefüllt, die wiederum aus dem Knochenmark oder aus Reservoirs der Milz entstammen (Swirski et al., 2009). Diese werden in den Blutkreislauf entlassen und nach ein bis drei Tagen spezialisieren sie sich im Zielgewebe (Taylor et al., 2003). Pathologische Prozesse im ZNS führen demnach zu einer erhöhten Anzahl von Spezifizierungen zu Mikroglia (Honjoh et al., 2019; Orihuela et al., 2016).

Diese vermehrte Rekrutierung kann zu einer vermehrten Ausschüttung potenziell toxischer Mediatoren führen (Gordon, 2003). Es wird postuliert, dass unter bestimmten Konditionen Mikroglia nicht nur ihre eigentliche Funktion verlieren, sondern auch für das umliegende Gewebe eine schädliche Rolle einnehmen. Dies geschieht durch Sekretion von Sauerstoffradikalen und pro - inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin E2 (PGE2). Diese inflammatorischen Stimuli und Toxine greifen Neurone und essenzielle Strukturen der zellulären Matrix an. Sterbende Nervenzellen geben weitere inflammatorische

Zytokine ab und rekrutieren Mikroglia (Block et al., 2007; Gordon & Taylor, 2005; Block & Hong, 2005). Dabei scheint auch der Verlust der Kommunikation zwischen nekrotischen Nervenzellen und Mikroglia zu einem Kontrollverlust zu führen, welche eine Exazerbation der Pathologie hervorruft (Polazzi & Contestabile, 2002). Es bildet sich eine generalisierte Inflammation, die auch andere Neurone schädigt, die ursprünglich nicht betroffen waren.

Mikroglia sind somit prinzipiell im Stande, sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Funktionen einzunehmen (Streit, 2002).

## **2.4 Polarisierung von Makrophagen**

Makrophagen werden in zwei Subpopulationen unterteilt, welche unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Dies sind zum einen die inflammatorischen M1-Makrophagen und zum anderen die anti-inflammatorischen M2-Makrophagen (Biswas et al., 2012; Cassetta et al., 2011). Makrophagen können von einem Phänotyp zum anderen wechseln (Sica & Mantovani, 2012).

Die M1 und M2 Polarisation wird auch bei Mikroglia im ZNS unmittelbar nach Gewebeschäden beobachtet. Dabei wird durch M1-Mikroglia eine Inflammation initiiert (Dall'Asta et al., 2012). Diese wird durch inflammatorische Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$  und Lipopolysaccharide stimuliert (Galli et al., 2011; Martinez et al., 2008). Aktivierte M1-Mikroglia exprimieren dann weitere pro-inflammatorische Zytokine (Murray & Wynn, 2011).

Eine gegenteilige Funktion üben M2-Makrophagen bzw. Mikroglia aus. Diese alternativ aktivierten Abwehrzellen blockieren pro-inflammatorische Signale und schütten neurotrophe Faktoren (Faktoren zum Überleben und Wachstum von Nervenzellen) sowie anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-13 aus (Mantovani et al., 2013; Liao et al., 2012; Mantovani et al., 2005; Gordon & Taylor, 2005). Dabei unterstützen sie z.B. die Regeneration von Axonen nach ZNS-Verletzung (Kigerl et al., 2009), die Wundheilung (Odegaard et al., 2007) und das Überleben von Motoneuronen durch funktionelle Antagonisierung von M1 (Liao et al., 2012). Je nach Signal und Funktion können in Mikroglia verschiedene Enzyme, Antigene und Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden (Hu et al., 2014). Zwei dieser Marker sind die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) und die Arginase 1. Im Zuge der M1 Polarisierung wird Arginin von der

NO-Synthase zu NO und Citrullin metabolisiert. Erhöhte lokale Konzentrationen von NO wirkt toxisch, inflammatorisch und verhindert die Zellproliferation (Kashfi et al., 2021). Im Kontrast dazu steht die Arginase 1, welche besonders im Zuge der M2 Polarisierung exprimiert wird. Dieses Enzym hydrolysiert Arginin zu Ornithin und Harnstoff. Damit fördert es die Zellproliferation und ist antiinflammatorisch (Yin et al., 2020).

Bei einer Verschiebung der M1 zu einer M2 Polarisation reduziert sich die Expression der NOS und die der Arginase 1 steigt (Caldwell et al., 2018; Villalta et al., 2009; Munder et al., 1999). Somit ist die Arginase 1 die "Gegenspielerin" der Sekretion von NO durch Reduktion des verfügbaren Arginins (Rath et al., 2014; Pesce et al., 2009; El Kasmi et al., 2008; Satriano, 2004; Brightbill et al., 1999).

Die in Makrophagen und Mikroglia vorkommende induzierbare NO-Synthase (iNOS) in M1 und die Arginase 1 in der M2 Polarisation lassen sich immunhistochemisch anfärben und sind Marker für entsprechend polarisierte Mikroglia (Orihuela et al., 2016; Colton, 2009; Henkel et al., 2009).

Auch bei der ALS wird im Krankheitsverlauf eine Polarisierung der Mikroglia, die um betroffene Motoneurone lokalisiert sind, beobachtet. Post mortem Studien zeigen sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen mit SOD1 Mutation, dass während der progressiven Degeneration der Motoneurone sowohl Mikroglia als auch Astrozyten aktiviert sind (An et al., 2014; Henkel et al., 2004; Alexianu et al., 2001; Ince et al., 1996). Diese Mikroglia sind zusammen mit infiltrierende Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen auch vor Beginn der ersten Degeneration von Motoneuronen nachgewiesen (Hensley et al., 2003; Yoshihara et al., 2002).

Zu Beginn der Erkrankung wird mehrheitlich ein M2 Phänotyp beobachtet, der unter anderem vermehrt im lumbalen Rückenmark von präsymptomatischen Mäusen nachweisbar ist (Gravel et al., 2016). Dies ändert sich im Krankheitsverlauf. Bei symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Tieren werden vor allem M1-polarisierte Mikroglia, die inflammatorische Zytokine exprimieren, beobachtet (J. Zhang et al., 2018; Henkel et al., 2006; Hensley et al., 2002; Alexianu et al., 2001).

Die Funktion der Mikroglia in der ALS ist bislang ungeklärt, aber eine Depletion von Mikroglia führt bei SOD1<sup>G93A</sup> transgenen Mäusen zu einer Abschwächung der Krankheitsprogression und einem verlängerten Überleben (Martínez-Muriana et al., 2016).

## **2.5 Rolle von Makrophagen und Mikroglia nach einer Nervenverletzung**

Eine periphere Nervenverletzung kann durch ein Trauma, eine Kompression, ein Tumor, oder eine systemische Erkrankung (z.B. Diabetes oder eine Autoimmunerkrankung) hervorgerufen werden. Sie führt immer zu einer Rekrutierung von Makrophagen im peripheren Nerven, aber auch von Mikroglia im zugehörigen Rückenmarkssegment (Inoue & Tsuda, 2018). Auch Schwann-Zellen rekrutieren Makrophagen (Moran & Graeber, 2004). Schwann-Zellen sind für die Myelinisierung von Axonen zuständig und schütten im Falle einer Nervenverletzung Zytokine aus, welche Makrophagen erkennen können (Brück, 1997). Dabei ist die Anzahl der aus dem Knochenmark rekrutierten Makrophagen größer als die der gewebständigen Makrophagen (Gautier et al., 2012). Makrophagen sind bei peripherer Nervenverletzung für die Auslösung einer Inflammation über die Ausschüttung von Zytokinen und Signalisierung anderer Immunzellen zuständig. Des Weiteren spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung durch den Abbau von apoptotischen Zellen und Zelldebris (Nazareth et al., 2021; Zhang et al., 2021; Nourshargh & Alon, 2014).

Mehr als die Masse scheint die Qualität der Abwehrzellen für die Regeneration von Axonen eine Rolle zu spielen. So führt eine Polarisation zum M2-Typ zu einer verbesserten Regeneration geschädigter Axone in einem Nervenverletzungsmodell. Eine pharmakologische Polarisierung von Makrophagen hin zu einem M2-Typ führt zu einer verbesserten Regeneration des peripheren Nerven (Mokarram et al., 2012). Es kommt aber auch im entsprechenden Rückenmarkssegment zu einer Migration von Mikroglia um die zugehörigen Motoneurone und sensiblen Nervenzellkerne im Spinalganglion (Inoue et al., 2018; Svensson et al., 1994; Graeber et al., 1988; Kreutzberg, 1986). Diese Aktivierung findet ausschließlich auf Rückenmarksebene statt und findet sich nicht in supraspinalen Regionen des ZNS (Zhang et al., 2008).

Am ersten Tag nach einer peripheren Nervenverletzung nimmt die Zahl der Mikroglia im entsprechenden Rückenmarkssegment zu und erreicht ein Maximum nach fünf Tagen. Bis zu 15 Tagen ist diese Mikrogliose nachzuweisen und normalisiert sich wieder zwischen Tag 20 und 30 (He et al., 1996).

Die Signalkaskade für die Mikrogliaakkumulation ist noch nicht abschließend geklärt, aber die Interaktionen der Zellen untereinander, z.B. über synaptische Moleküle werden bei der Mikroglia migration beobachtet (Aldskogius, 2011). Verschiedene membranständige Rezeptoren können Mikroglia entweder aktivieren oder in eine

Ruhephase versetzen. Einer der aktivierenden Rezeptoren, die auf Mikroglia zu finden sind, ist der „Receptor for advanced glycation endproducts“ (RAGE). Als „pattern recognition receptor“ (PRR) erkennt dieser antigenrepräsentierende Bestandteile von Pathogenen und löst eine Signalkaskade aus. Über intrazelluläre Signalwege wird die Produktion von „microglial macrophage colony-stimulating factor“ (m-csf) und inflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1) simuliert, die wiederum andere Mikroglia aktivieren (Hu et al., 2014). Außerdem aktivieren Mikroglia auch andere Funktionen des innate Immunsystems wie zum Beispiel das Komplementsystem. Pathogene werden zur Erleichterung der Phagozytose vom Komplementsystem markiert und weitere Zytokine exprimiert (Svensson et al., 1995). Zusätzlich geben Axone Signale über ihren Verletzungsstatus an die Perikarya ab (Hanz & Fainzilber, 2006).

In betroffenen Neuronen kommt es auch zu Änderungen der Gentranskription. Diese transkribieren vermehrt wachstumsassoziierte Gene, wie neurotrophe Faktoren, Transkriptionsfaktoren und Moleküle für axonalen Transport (Richardson et al., 2009). Außerdem werden weitere Immunzellen durch Expression von Zytokinen aus dem Blutkreislauf rekrutiert (Rotterman et al., 2019). Diese Kaskade ist allerdings nur auf die lokalen Nervenkerne der betroffenen Nerven beschränkt (Kobbert & Thanos, 2000).

Obwohl bereits bekannt ist, dass es nach peripherer Nervenverletzung zu einer Akkumulation von Mikroglia im Rückenmark kommt, die wiederum eine Änderung der Expression von Zytokinen und neurotrophen Wachstumsfaktoren zur Folge hat, so sind deren Konsequenzen für die exponierten Motoneurone ungeklärt. Da Mikroglia beide Funktionen neuroprotektive und neurotoxische einnehmen können, ist es prinzipiell möglich, dass eine Aktivierung vermehrt einer der beiden Rollen zufällt.

Bei einer Rückenmarksverletzung, also einer direkten Verletzung der Nervenkerne kommt es ebenfalls zu einem sekundären Schaden, welcher durch eine von apoptotischen und nekrotischen Zellen ausgelöste Dysbalance von Elektrolyten, freien Radikalen und Zytokinen ausgelöst wird. Durch diese Inflammation ist eine Reaktion nicht nur auf die betroffene Region beschränkt, sondern greift auch auf benachbarte Segmente über (Zhou et al., 2014). Ob ähnliche Mechanismen nach einer peripheren Nervenverletzung im Rückenmark stattfinden ist ungeklärt.

Auf der anderen Seite beobachteten Hao et al., dass in Mäusen mit Cathepsin S defizitären Mikroglia die Motoneurone auf Rückenmarksebene nach einer peripheren Nervenverletzung vermehrt zu Grunde gehen. Cathepsin S ist ein Proteasom welches

Zellbestandteile zerkleinert, um diese dann für die Antigenrepräsentierung bereit zu stellen. Nach peripherer Nervenverletzung kam es in den Cathepsin S knock-out Mäusen zu einer geringeren Rekrutierung anderer Immunzellen und Mikroglia. Dies führte zu einer geringeren Überlebensanzahl von Motoneuronen in den betroffenen Regionen. Die Daten implizieren, dass Mikroglia über Cathepsin S eine protektive Rolle für Motoneurone nach Axotomie einnehmen (Hao et al., 2007).

Zusammenfassend ist es bisher unklar ob nach einer peripheren Nervenverletzung im Bereich des Vorderhorns Mikroglia aktiviert werden, welchen Phänotyp sie entwickeln und welche Funktion sie hinsichtlich der nachfolgenden Regeneration bzw. Degeneration einnehmen. Es ist prinzipiell vorstellbar, dass Mikroglia auch eine weitergehende Degeneration induzieren und somit ein Mediator einer „transneuronalen Degeneration“ darstellen. Unter „transneuronaler Degeneration“ versteht man eine über die eigentlich betroffene Region hinausgehende Degeneration. Sie ist bedingt durch die untereinander vernetzten Neurone des ZNS. Dieses „Konnektom“ kann antegrad oder retrograd durch eine massive Ausschüttung von Neurotransmittern oder Zytokinen durch folgende Inflammation geschädigt werden (M. You et al., 2021; Y. You et al., 2019).

Von besonderer Relevanz ist diese Fragestellung für die ALS, bei der es zu einem progredienten Untergang von Motoneuronen u.a. auch auf spinaler Ebene kommt (Marinkovic et al., 2012; Eisen & Weber, 2001; Zhang et al., 1997). Daher ist es relevant, die Veränderung der Funktion von Mikroglia auf Rückenmarksebene im Tiermodell der ALS, d.h. in SOD1<sup>G93A</sup> zu untersuchen. Prinzipiell wäre vorstellbar, dass eine aberrante Mikrogliaakkumulation bei SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen zu einer progredienten Schädigung der Motoneurone beiträgt.

## **2.6 Zielsetzung der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die Auswirkungen einer peripheren Nervenverletzung des N. peroneus auf den unverletzten, benachbarten N. tibialis zu charakterisieren. Es wird postuliert, dass durch eine periphere Nervenverletzung eine Aktivierung von Mikroglia im Rückenmark hervorgerufen wird, die die Funktion der benachbarten Motoneurone beeinflusst. Es soll untersucht werden, ob die Akkumulation von Mikroglia neuroprotektiv oder neurotoxisch auf die Funktion der Neurone des N. tibialis wirken.

Zudem wird untersucht, ob die Mikrogliose zu einer Schädigung vulnerabler Motoneurone führt. Hierzu wird der Effekt in Wildtypmäusen mit einem Mausmodell der amyotrophen Lateralsklerose (ALS), dem SOD1<sup>G93A</sup> Mausmodell verglichen. Diese Mäuse entwickeln eine Degeneration von Motoneuronen. Im präsymptomatischen und symptomatischen Stadium werden die Auswirkungen der Nervenverletzung im Hinblick auf eine fortschreitende Neurodegeneration der Motoneurone erforscht.

Die gewonnenen Erkenntnisse können zum Verständnis der Auswirkungen einer Nervenverletzung beitragen und Effekte auf unverletzte Nerven beleuchten. Dazu werden Unterschiede in einer neurodegenerativen Erkrankung erforscht. Dies kann möglicherweise bei der Entwicklung von Therapiekonzepten sowohl nach Nervenverletzung als auch bei der ALS helfen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Invitrogen
Buprenorphin	Indivior
Carprofen	Zoetis
DNase/RNase freies Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Invitrogen
EDTA	Carl Roth GmbH
Eselserum (Normal donkey serum)	Sigma Aldrich
Essigsäure	Carl Roth GmbH
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH
FluoroGold	Fluorocrome Inc.
Fluoromount	Southern Biotech
Gel red	Dako
Gelstift (Liquid blocker)	Science Services
Hoechst 33342	Sigma Aldrich
Isofluran	Abbvie
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Ketamin	Inresa
Leiter (100bp)	Promega
Natriumchlorid-Infusionslösung 0,9%	Berlin-Chemie AG
NaCl	Carl Roth GmbH
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH
Pferdeserum (Normal horse serum)	Vector Laboratories
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Thermo Scientific
Proteinase K	Lucigen
SDS	Sigma
Sukrose	Sigma Aldrich
Tissue Tek	Sakura Finetec Inc
Toluidinblau	Sigma Aldrich
Tris	Carl Roth GmbH

Triton™ X-100	Sigma Aldrich
Xylazin	Bayer AG

**Tabelle 1 Chemikalien**

### 3.1.2 Kits

Kit	Hersteller
GoTaq® Kit	Promega

**Tabelle 2 Kits**

### 3.1.3 Primer

Primer	Sequenz 5'→3'	Hersteller
Maus SOD1 <sub>G93A</sub> vorwärts (fw)	CATCAGCCCTAAACCATCTGA	Biolegio
Maus SOD1 <sub>G93A</sub> rückwärts (rv)	CGCGACTAACAATCAAAGTGA	Biolegio

**Tabelle 3 Primer**

### 3.1.4 Antikörper

Primärantikörper	Wirt	Dosierung	Hersteller
Anti-Iba1 Polyclonal Antibody	Kaninchen	1/500	Wako 019- 19741
Anti-iNOS Monoclonal Antibody	Kaninchen	1/100	Cell Signaling (D6B6S) #13120
Anti-Arginase 1 Polyclonal Antibody	Kaninchen	1/200	GeneTex (GTX 109242)

**Tabelle 4 Primärantikörper**

Sekundärantikörper	Wirt	Antigen	Dosierung	Hersteller
Alexa Fluor 568 Goat anti-Rabbit IgG Antibody	Ziege	Kaninchen	1/500	Invitrogen

**Tabelle 5 Sekundärantikörper**

### 3.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
Chirurgiemikroskop	Schott
Elektroneurographieaufbau (PowerLab signal acquisition set-up)	ADInstruments
Fluoreszenzmikroskop/Lichtmikroskop (Biorevo BZ- 9000)	Keyence Corp.
Gelkammer	Thermo Scientific
Hitzeschüttler	Eppendorf AG
Kryostat CM3050S	Leica AG
PCR Thermocycler (RotorGene 3000)	Corbett Research
Pipetten (5, 10, 20, 200, 1000 µl)	VWR
Spannungsgeber Elektrophorese	Consort
UV- Leuchttisch	Bio Budget Technologies
Vortexer	IKA-Labortechnik
Zentrifuge (5417C)	Eppendorf AG

**Tabelle 6 Geräte**

### 3.2 Tierhaltung und Versuchstiermodell

Für das Tiermodell wurden 60-80 Tage alte Wildtypmäuse vom Stamm C57BL/6 und 60 Tage alte Mäuse mit einer Mutation der Superoxiddismutase 1 (SOD1<sub>G93A</sub>) beiderlei Geschlechts verwendet (The Jackson Laboratory B6SJL.SOD1-G93A). Diese Mutation führt zu einer Degeneration von Motoneuronen und ist dem Krankheitsverlauf der amyotrophen Lateralsklerose sehr ähnlich. Bis zum Alter von etwa 60 Tagen zeigen die transgenen Mäuse keinen Phänotyp, sie sind präsymptomatisch. Die Mäuse zeigen noch keine Symptome, aber bereits biochemische Veränderungen in Form von Denervierungen von motorischen Endplatten und Akkumulation von Mitochondrien in Neuronen (Fischer et al., 2004; Hall, et al., 1998; Chiu et al., 1995).

Außerdem wurden 115 Tage alte, symptomatische SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse verwendet. In diesem Alter zeigen sich erste Symptome wie Muskelschwäche in den Extremitäten und Gewichtsabnahme (Chiu et al., 2008).

Bei einer Durchschnittstemperatur von  $21 \pm 1$  °C und einer Luftfeuchte von  $60 \pm 5$  % wurden die Mäuse in der Tierhaltung des Instituts für experimentelle Medizin gehalten. Der zirkadiane Rhythmus wurde durch einen 12-stündigen Belichtungswechsel gewährleistet. Futter und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Operationen wurden in den Versuchsräumen der experimentellen Medizin der Universität zu Köln durchgeführt. Für alle Versuche bestand für die Dauer der Experimente eine Tierhaltungs- und Versuchsgenehmigung. Somit wurden die Bedingungen zur Durchführung von Tierversuchen gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes erfüllt.

### 3.3 Genotypisierung

Es wurden heterozygote, männliche SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse mit Wildtypweibchen gekreuzt. Schwanzspitzen der Nachkommen wurden für die Extrahierung der genomischen DNA entnommen. Danach wurden sie mit 247,5 µl Lysepuffer (**Tab. 7**) und 2,5 µl Proteinase K (20 U/ml) versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Ungelöste Komponenten wurden durch zehnminütiges Zentrifugieren mit 13.000 rpm bei 20°C getrennt und verworfen. Zum Überstand wurden 250 µl Isopropanol hinzugefügt, durchmischt und für 10 min. bei 20°C mit 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA Pellet mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets für zwei Stunden bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Zum

Schluss wurde die DNA mit 50 µl DNase/RNase freiem ddH<sub>2</sub>O über Nacht bei 20°C resuspendiert.

<b>Lysepuffer</b>	100 mM Tris pH 8,5
	200 mM NaCl
	5 mM EDTA
	0,2% SDS

**Tabelle 7 Lysepuffer**

### 3.4 Polymerase - Kettenreaktion

Die Reaktionsmischung für die Polymerase – Kettenreaktion (PCR) wurde nach Vorgabe des GoTaq® Kits (Promega) hergestellt (**Tab. 8**). Die Primer wurden nach dem Standardprotokoll der JAX Genotypisierungsdatenbank (The Jackson Laboratory) von Biologio hergestellt: Vorwärtsprimer (fw) 5'-CAT CAG CCC TAA ACC ATC TGA- 3' und Rückwärtsprimer (rv) 5'-CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA 3'.

Reaktionsmischung	Volumen (µl)
Primer-fw (20 pmol/µl)	1,0
Primer-rv (20 pmol/µl)	1,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,0
dNTP's (2,5 mM)	1,0
5 x PCR-Puffer	5,8
Taq-Polymerase (500 U)	0,2
DNA	2,0
dH <sub>2</sub> O	13,0
<b>Total</b>	<b>25</b>

**Tabelle 8 PCR Reaktionsmischung für eine SOD1<sup>G93A</sup> Maus**

Reaktanten für die PCR, dem GoTaq® Kit (Promega) entnommen und anschließend die Primer und DNA hinzugegeben.

Danach wurde die PCR im Thermocycler RotorGene 3000 (Corbett Research) durchgeführt. Der Zyklus wurde in das Programm RotorGene6 (Corbett Research)

eingegeben. Zunächst wurde die cDNA bei 94°C für zwei min. denaturiert. Danach wurde folgender Zyklus; 94°C für 30 sek., 60°C für 30 sek., 72°C für 45 sek., 40-mal wiederholt und abschließend bei 72°C für zwei Minuten beendet.

Eine Agarose Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um die PCR Produkte auszuwerten. 300 ml 1x TAE Puffer (**Tab. 9**) wurde mit 4,5g Agarose in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Anschließend wurde 15 µl Gel red (Dako) hinzugefügt. Sobald die Agarose sich verfestigt hatte, wurde die Kammer mit 1xTAE Puffer aufgefüllt. Die Geltaschen wurden mit je 10 µl Reaktionsmischung gefüllt, ein Leiter (100 Basenpaare) wurde in die erste und letzte Tasche gegeben. Zur Aufteilung der DNA-Fragmente wurde das Gel bei einer Spannung von 170 Volt für 45 min. geladen. Durch die Fluoreszenz des Gel red ließen sich auf einem UV-Leuchttisch die SOD1<sub>G93A</sub> Mutationen kenntlich machen.

---

<b>TAE Puffer</b>	242g Tris base
	57,1 ml Essigsäure
	100 ml (500 nM EDTA (pH 8,0))
	Auf 1 Liter mit H <sub>2</sub> O auffüllen für 50 x Puffer

---

**Tabelle 9 TAE Puffer**

## **3.5 Operation**

### **3.5.1 Operationseinleitung**

Es wurden zwei Versuchsgruppen gebildet. Der ersten Gruppe wurde der Nervus peroneus des linken Hinterlaufs zusammengedrückt (**Kapitel 3.5.3**). Die zweite Versuchsgruppe bekam zusätzlich zu der Verletzung noch der Tracer FluoroGold (Fluorochrome Inc.) injiziert (**Kapitel 3.5.4**). Jede Versuchsgruppe bestand aus je 5 Mäusen Wildtyp (60 - 80 Tage), SOD1<sub>G93A</sub> präsymptomatisch (60 ± 2 Tage), SOD1<sub>G93A</sub> symptomatisch (105 ± 2 Tage) und jeweils 2 - 3 Kontrolltieren gleichen Alters. Es wurden männliche und weibliche Tiere in gleichem Verhältnis ausgewählt.

Beide Versuchsgruppen wurden nach dem gleichen Protokoll operiert und postoperativ behandelt. Initial wurde die Operation in einer Narkosebox mit einem Gasgemisch aus 3-4% Isofluran, 0,4% Luft und 0,2% Sauerstoff eingeleitet. Zur Vermeidung

postoperativer Schmerzen wurde eine gewichtsadaptierte Dosis des Analgetikums Buprenorphin (0,1mg/kg) oder Carprofen (5mg/kg) subkutan verabreicht.

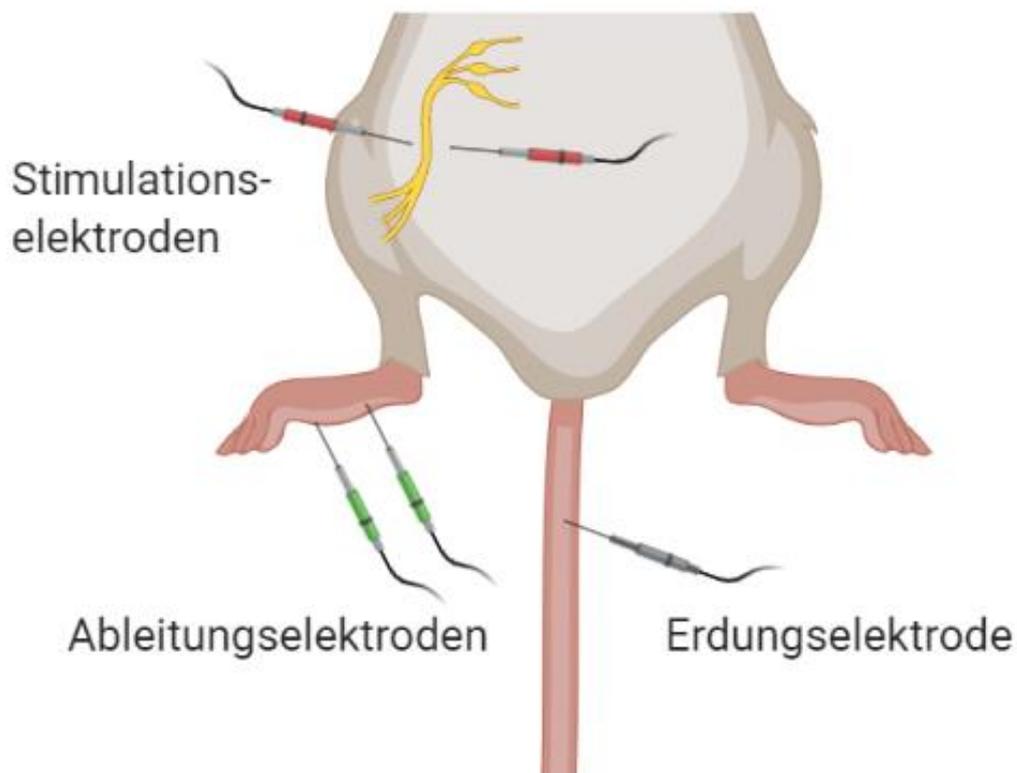
Nach der Einleitung der Narkose wurde die Maus auf eine Wärmeplatte gelegt und über einen Isofluranverdampfer (2% Isofluran, 0,4% Luft, 0,2% Sauerstoff) die Narkose aufrechterhalten. Bepanthen Augensalbe wurde als Austrocknungsschutz aufgetragen. Durch das Ausbleiben eines Schmerzreflexes der Hinterbeine wurde die chirurgische Toleranz festgelegt.

### **3.5.2 Elektroneurographie**

Elektroneurographische Messungen wurden an Tag 0 und Tag 7 nach Nervenverletzung durchgeführt. Kontrolltiere wurden an Tag 0 und 7 gemessen und nicht operativ behandelt.

Mit Hilfe einer elektrischen Stimulation des Nervs konnte ein Aktionssummenpotential gebildet werden, welches über Ableitungselektroden im innervierten Muskel abgeleitet wurde. Über dieses Muskelsummenaktionspotential ließ sich die Nervenleitgeschwindigkeit des N. tibialis messen (**Abb. 3**). Die vorhandene Wärmeplatte sollte eine Unterkühlung der Tiere und temperaturbedingte Schwankungen der Nervenleitgeschwindigkeiten vermeiden. Alle elektroneurographischen Messungen wurden durch PowerLab signal acquisition set-up (ADInstruments) erhoben und über das Programm Scope4 (ADInstruments) bearbeitet.

Der elektrische Impuls erfolgte über zwei Reizelektroden, die den N. ischiadicus stimulierten. Diese wurden jeweils lateral und medial des Austritts des Nervs auf Höhe der Spina iliaca posterior superior in die Muskulatur eingestochen. Die zwei Ableitungselektroden wurden an der medialen Plantarseite der Hinterpfote, in den durch den N. tibialis innervierten Muskel, platziert. Als Erdung diente eine Neutralelektrode im proximalen Abschnitt des Schwanzes.



### Abbildung 3 Aufbau der elektroneurographischen Messungen

Das Muskelsummenaktionspotential (MSAP) wird gebildet, indem die Stimulationselektroden einen elektrischen Reiz an den N. ischiadicus abgeben. Dieser Reiz wird von den Ableitungselektroden der Muskeln der Hinterpfote als MSAP des innervierenden N. tibialis aufgezeichnet und graphisch dargestellt. Die Elektrode im Schwanz dient der Erdung (Abbildung erstellt auf <https://biorender.com>).

Der elektrische Stimulus wurde über 0,1 sek. mit einer Stromstärke von 20 mA abgegeben.

Amplituden von Messungen  $<5\text{mV}$  wurden hierbei bei allen drei Versuchstiergruppen nicht berücksichtigt, da hierbei davon auszugehen ist, dass es sich um eine Fehlmessung oder eine falsche Platzierung der Messelektroden handelte.

### 3.5.3 Periphere Nervenverletzung

Nach Prüfung einer ausreichend tiefen Analgosedierung durch Nachweis einer Areflexie, wurde die Maus in Bauchlage an den Vorder- und Hinterläufen fixiert. Mit einem

Tierhaarrasierer wurde die Lateralseite des linken Oberschenkels rasiert und anschließend mit einem Hautantiseptikum desinfiziert.

Mit einem Skalpell wurde 35 mm rostral des Mittelfußes, lateral am Oberschenkel ein Schnitt durch die Haut geführt. Dieser wurde mit einer Operationsschere subkutan stumpf erweitert und nach Durchtrennung der Muskulatur wurde der N. ischiadicus sichtbar. An operierter Stelle teilte sich der Nerv in seine drei Endäste, den N. tibialis, N. peroneus und N. suralis auf. Anschließend wurde der lateral verlaufende Nerv vom zentral verlaufenden dicksten Nerv (N. tibialis) vorsichtig gelöst (Batt & Bain, 2013; Dalkin et al., 2016). Der freipräparierte N. peroneus wurde so weit proximal wie möglich mit einer Pinzette 30 sek. lang zusammengedrückt. Anschließend wurden die Muskelfaszien mit Polyamidfaden (Ethilon II 4-0, Johnson & Johnson Inc.) zugenäht. Während die Isoflurandosis langsam reduziert wurde bis eine Spontanatmung einsetzte, wurde die Hautwunde verschlossen und mit einer Natriumchloridlösung (0,9%) gereinigt.

Anschließend wurden die Mäuse einzeln gehalten und täglich auf Schmerzzeichen kontrolliert. Dies wurde auf einem Schmerzerfassungsbogen protokolliert und die Maus bei Bedarf mit Buprenorphin (0,1mg/kg) oder Carprofen (5mg/kg) analgesiert. Spätestens zwei Tage nach der Operation waren keine Schmerzzeichen mehr zu erkennen.

#### **3.5.4 Tracerinjektion**

Für die zweite Versuchsreihe wurden je fünf Tiere pro Gruppe (Wildtyp, SOD1<sup>G93A</sup> präsymptomatisch, SOD1<sup>G93A</sup> symptomatisch) zuerst nach oben beschriebenem Protokoll neurographiert, der N. peroneus mechanisch komprimiert und die Wunde genäht.

Anschließend wurden sowohl der linke als auch der rechte Hinterlauf nach innen rotiert und mit Klebeband fixiert. Nun konnte man den großen Wadenmuskel (M. gastrocnemius) erkennen. Die Haare wurden beidseits mit einem Tierhaarschneider entfernt und die Haut desinfiziert. Nachdem ca. 0,5 cm unterhalb der Kniekehle ein Horizontalschnitt durch die Cutis und Subcutis mit Skalpell geführt wurde, waren beide Muskelköpfe des M. gastrocnemius freipräpariert. Mit einer 10 µl Mikrospritze (Hamilton Company) wurde die Faszie durchstoßen und pro Muskelkopf 4 µl einer 5% FluoroGold Lösung (Fluorochrome Inc.) injiziert. Dies geschah sowohl auf der operierten Seite als auch am anderen Hinterlauf. Um einen Rückfluss des Tracers zu unterbinden

wurde die Mikrospritze ca. eine Minute im Muskel belassen. Danach wurde die Faszie mit Kochsalzlösung gewaschen und die Haut genäht.

Den Kontrollmäuse der jeweiligen Versuchstiergruppen wurde lediglich der Tracer injiziert. Nach dem Nähen der Wunde wurden sie in den Käfig zurückgesetzt.

### **3.6 Organasservierung**

#### **3.6.1 Perfusion**

Am siebten Tag nach der Operation wurden die Mäuse aller Versuchsreihen mit einer vierprozentiger Paraformaldehydlösung (4% PFA) perfundiert.

Es wurde zunächst ca. 200 µl einer Lösung aus Ketamin und Xylazin (10mg/ml Ketamin, 20mg/ml Xylazin, in NaCl 0,9%) intraperitoneal verabreicht. Nach ca. 10 - 15 min. wurde aufgrund fehlender Schmerzreflexe die chirurgische Toleranz festgestellt. Die Maus wurde in Rückenlage fixiert. Mit einer Schere wurde der Thorax aufgeschnitten und das Herz freipräpariert. PBS wurde mit einer Pumpe in den linken Ventrikel geleitet und der rechte Ventrikel aufgeschnitten, um das Blut aus dem Kreislauf abzulassen. Nachdem das gesamte Blut entfernt wurde, leitete man 4% PFA in den Kreislauf. Wenn sich der Schwanz der Maus anhob, war eine gute, vollständige Perfusion erreicht. Falls dies nicht der Fall war, wurden weitere 40 ml 4% PFA eingeleitet.

#### **3.6.2 Gewebentnahme Rückenmark**

Mit einer Schere wurde, am Schwanz beginnend, die Wirbelsäule vom Körper getrennt. Unter einem Mikroskop wurden die einzelnen Wirbelkörper lateral mit einer Schere aufgetrennt und das Rückenmark dabei unbeschädigt offengelegt. Anhand beschriebener Landmarken (Harrison et al., 2013), wurden die gesuchten Rückenmarksabschnitte L3 - L5 identifiziert und freipräpariert. Nach dem Abtrennen der zu- und abgehenden Nervenstränge wurde der Rückenmarksabschnitt herausgelöst. Das Gewebe wurde in 4% PFA bei 4°C für 24h gelagert und danach in 30% Sukroslösung für weitere 24 h bei 4°C aufbewahrt.

Anschließend wurden die Schnitte in TissueTek eingebettet und 1h bei -20°C eingefroren. Danach wurden mit dem Kryostaten 30 µm dicke Querschnitte angefertigt. 6 - 8 Schnitte wurden auf einem Objektträger platziert und bei -80 °C bis zur Benutzung gelagert.

### 3.6.3 Entnahme des Nervus tibialis

Mit einer Schere wurde breitflächig die Haut der Dorsalseite des Hinterlaufs eröffnet. Danach wurden vorsichtig die Faszien und Muskeln freigelegt, wobei an der ipsilateralen Seite die Operationsnaht als Orientierung diente. Danach wurde der N. ischiadicus dargestellt und distal verlaufendes Binde- und Muskelgewebe bis zur Trifurkation entfernt. Schließlich wurde der N. tibialis als medial verlaufender und prominentester Nerv identifiziert. Ein ca. 0,1 - 0,2 cm langer Abschnitt wurde möglichst proximal entnommen. Bis zur Aufbereitung wurde dieser in 4% PFA bei 4°C gelagert.

## 3.7 Immunhistochemie

### 3.7.1 Mikroglia

Um die zentrale Mikrogliaakkumulation nach einer peripheren Nervenverletzung zu quantifizieren, ist die Iba1 Immunfluoreszenzfärbung eine etablierte Methode, da Iba1 auf aktivierten Mikroglia und Makrophagen exprimiert wird (Calvo & Bennett, 2012).

In dem Abschnitt L3 - L5 des lumbalen Rückenmarks sind die Perikarya der Motoneurone des N. tibialis und N. peroneus lokalisiert (Bácskai et al., 2014). Es wurden pro Versuchstier drei Objektträger mit Schnitten aus dieser Region mit dem Antikörper gegen Iba1 gefärbt und anschließend der Träger ausgewertet, welcher die höchste Mikrogliaakkumulation zeigte.

Zuerst wurden die Objektträger ca. 5 min. bei 21°C aufgetaut. Um die Flüssigkeiten auf dem Träger zu halten, wurden diese mit einem Liquid Blocker (Science Services) umfahren. Anfangs wurde dreimal á 10 min. mit 1x PBS gewaschen. Dieser Ablauf war bei jeder Waschung identisch und wird im Folgenden nicht wiederholt beschrieben. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde als Blocklösung 10% Pferdeserum und 0,2% Triton X-100 in 1x PBS gelöst und 200 µl pro Objektträger hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation wurde erneut gewaschen. Schließlich wurde der Anti-Iba1 Primärantikörper (**Tab. 10**) in 1x PBS 1:500 verdünnt, 200 µl auf den Objektträger gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Rückstände der Primärantikörper abgewaschen und danach 200 µl des Sekundärantikörpers AlexaFluor 568 1:500 (**Tab. 10**) in 1x PBS draufgegeben. Nach 1,5-stündiger Inkubation

wurde gewaschen und von nun an alle weiteren Schritte im Dunkeln durchgeführt, um dadurch die Fluoreszenz nicht zu beeinflussen.

Um die Zellkerne der Mikroglia sichtbar zu machen, wurde anschließend mit 1:200 Hoechst 33342 (Sigma Aldrich) in 1x PBS für 10 min. inkubiert und abschließend ein letztes Mal gewaschen. Die Rückenmarksschnitte wurden mit je drei Tropfen Fluoromount und einem Glasplättchen abgedeckt und konserviert.

Zur Vermeidung von Signalüberlagerungen wurde kein Hoechst 33342 bei den Rückenmarksschnitten mit injiziertem Tracer hinzugegeben und nach dem Abwaschen des Sekundärantikörpers direkt eingedeckelt.

Abschließend wurden alle Schnitte über Nacht bei 20°C abgedunkelt getrocknet und anschließend im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Antikörper	Wirt	Antigen	Dosierung	Hersteller
Anti-Iba1 Polyclonal Antibody	Kaninchen	Iba1 (Mikroglia)	1:500	Wako 019-19741
Alexa Fluor 568 Goat anti-Rabbit IgG Antibody	Ziege	Kaninchen	1:500	Invitrogen

**Tabelle 10 Antikörper Mikrogliafärbung**

### 3.7.2 Immunhistochemie für M1/M2 polarisierte Mikroglia

Um inflammatorische (M1) und antiinflammatorische (M2) Polarisierungen von Mikroglia zu detektieren, wurden Rückenmarksschnitte mit Primärantikörpern gegen iNOS (M1) und gegen Arginase1 (M2) gefärbt. Rückenmarksschnitte aller drei Versuchstiergruppen wurden nach der Feststellung der richtigen Ebene (Mikrogliaakkumulation) ausgewählt und gefärbt. Als Positivkontrolle wurden Hirnschnitte nach einem induzierten Schlaganfall der Arbeitsgruppe Neuroimaging und Neuroengineering des experimentellen Schlaganfalls (Dr. Markus Aswendt) nach gleichem Protokoll gefärbt (Hamzei Taj et al., 2016a; Hamzei Taj et al., 2016b).

Zuerst wurden Objektträger ca. 5 min. bei 21°C aufgetaut. Um die Flüssigkeiten auf dem Träger zu halten, wurden diese mit einem Liquid Blocker (Science Services) umfahren. Anfangs wurde dreimal á 10 min. mit 1x PBS gewaschen, dieser Ablauf war bei jeder Waschung identisch und wird im Folgenden nicht wiederholt beschrieben.

Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde als Blocklösung 5% Eselserum und 0,25% Triton X-100 in 1x PBS verwendet und 200 µl pro Objektträger hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation wurde erneut gewaschen. Schließlich wurden einem Teil der Proben der Primärantikörper Anti - iNOS (1:100 in 1x PBS) und einem anderen Teil Anti - Arginase 1 (1:200 in 1x PBS) in oben genannter Blocklösung hinzugegeben (200 µl pro Objektträger) und über Nacht bei 4°C inkubiert (**Tab. 11**). Am folgenden Tag wurden die Rückstände der Primärantikörper abgewaschen und danach 200 µl des Sekundärantikörpers AlexaFluor 568 (**Tab. 11**) im Verhältnis 1:500 in der Blocklösung hinzugegeben. Nach 1,5h Inkubation wurde gewaschen und von nun an alle weiteren Schritte im Dunkeln durchgeführt, um dadurch die Fluoreszenz nicht zu beeinflussen. Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurde mit Hoechst 33342 (Sigma Aldrich) 1:200 in 1x PBS für 10 min inkubiert und abschließend ein letztes Mal gewaschen. Die Rückenmarksschnitte wurden mit je drei Tropfen Fluoromount und einem Glasplättchen abgedeckt und konserviert. Die Schnitte wurden über Nacht bei 20°C abgedunkelt getrocknet und anschließend im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Antikörper	Wirt	Antigen	Dosierung	Hersteller
Anti-iNOS Monoclonal Antibody	Kaninchen	iNOS (M1)	1:100	Cell Signaling (D6B6S) #13120
Anti-Arginase 1 Polyclonal Antibody	Kaninchen	Arginase 1 (M2)	1:200	GeneTex (GTX 109242)
Alexa Fluor 568 Goat anti-Rabbit IgG Antibody	Ziege	Kaninchen	1:500	Invitrogen

**Tabelle 11 Antikörper M1/M2 Färbung**

### 3.7.3. Semidünnschnitte des N. tibialis

Um eine Zählung der Axone durchzuführen, wurde eine Toluidinblau Färbung von Querschnitten verwendet. Es wurden 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, diese anschließend fixiert und mit Toluidinblau auf Superfrost Plus slides (Thermo Fisher Scientific) gefärbt.

## 3.8 Auswertung

Zur mikroskopischen Auswertung wurde das Immunfluoreszenzmikroskop BZ-9000 (Keyence Corp.) verwendet. Dabei wurden die Präparate mit Hilfe des Bioevo Viewers (Keyence Corp.) auf einem Computer betrachtet.

### 3.8.1 Mikrogliazählung

Die Rückenmarksquerschnitte wurden in zehnfacher Vergrößerung untersucht. Pro Tier wurden ein bis drei Rückenmarksschnitte verwendet, welche auf demselben Objektträger gefärbt wurden. Von der ipsi- und kontralateralen Seite wurden Bilder aufgenommen. Die Zahl der Mikroglia wurde mittels der Anwendung CellCounter des Bildauswertungsprogramms ImageJ bestimmt.

### 3.8.2 Nachweis des Tracers im Rückenmark

Um die Anzahl von Mikroglia um die Motoneurone des N. tibialis zu erfassen, wurden Bilder von Iba1+ Rückenmarksquerschnitten angefertigt und anschließend mittels ImageJ drei Interessensregionen (Region of interest (ROI)) als Kreise um das Signal der Zellkerne definiert. Es wurden ein bis drei Rückenmarksschnitte pro Tier ausgewertet, auf denen sowohl ipsi- als auch kontralateral ein Tracersignal und die Mikrogliaakkumulation nachweisbar waren.

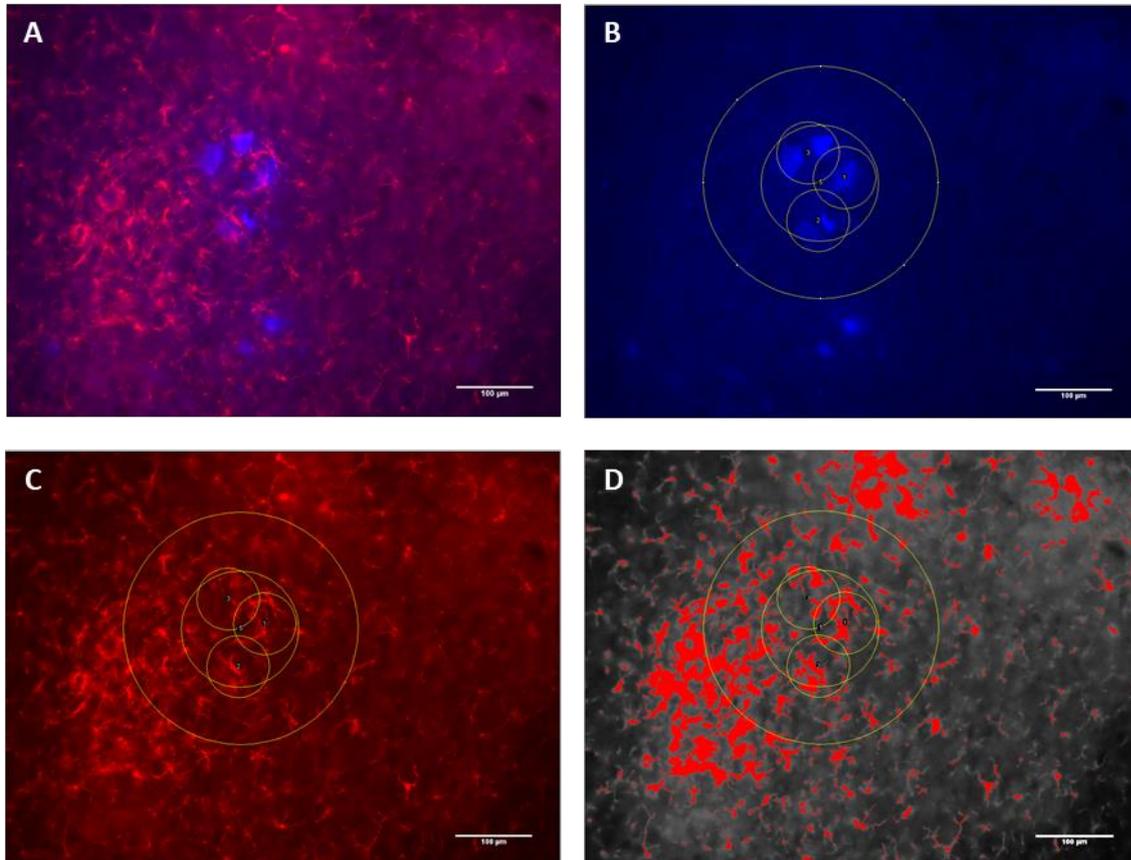
Zuerst wurde ein Kreis mit einem Durchmesser 81,91  $\mu\text{m}$  (0,8 inch) um jeden Zellkern gelegt. In diesem Kreis passten sowohl ein Motoneuron als auch angrenzende Mikroglia. Falls mehrere Signale von Motoneuronen vorhanden waren, wurden alle umkreist und anschließend ein Mittelwert dieser errechnet.

Der mittelgroße Kreis, welcher ungefähr drei der kleinsten ROI einschließt, hatte einen Durchmesser von 153,19  $\mu\text{m}$  (1,5 inch). Der größte definierte eine ROI mit einem Durchmesser von 306,38  $\mu\text{m}$  (3,0 inch). Er definiert einen doppelt so großen Radius wie die mittlere ROI (**Abb. 4 B**).

Um die Pixel der Fluoreszenz der Motoneurone in der Auswertung auszuschließen, wurden die Positionen der ROI gespeichert und nur das Iba1+ gefärbte Bild aufgerufen (**Abb. 4 C**). Dieses Bild wurde mittels ImageJ in eine 32-bit Auflösung überführt und die Mikroglia anschließend durch die Anwendung *threshold* quantifiziert (**Abb. 4 D**).

Die Zahl der Pixel innerhalb der drei RIO wurde erfasst.

Dieser Prozess wurde mit ein bis drei Färbungen pro Tier nach analogem Schema wiederholt. Abschließend wurden die Interessensregionen der ipsilateralen Seite mit der dazugehörigen kontralateralen Seite verglichen.



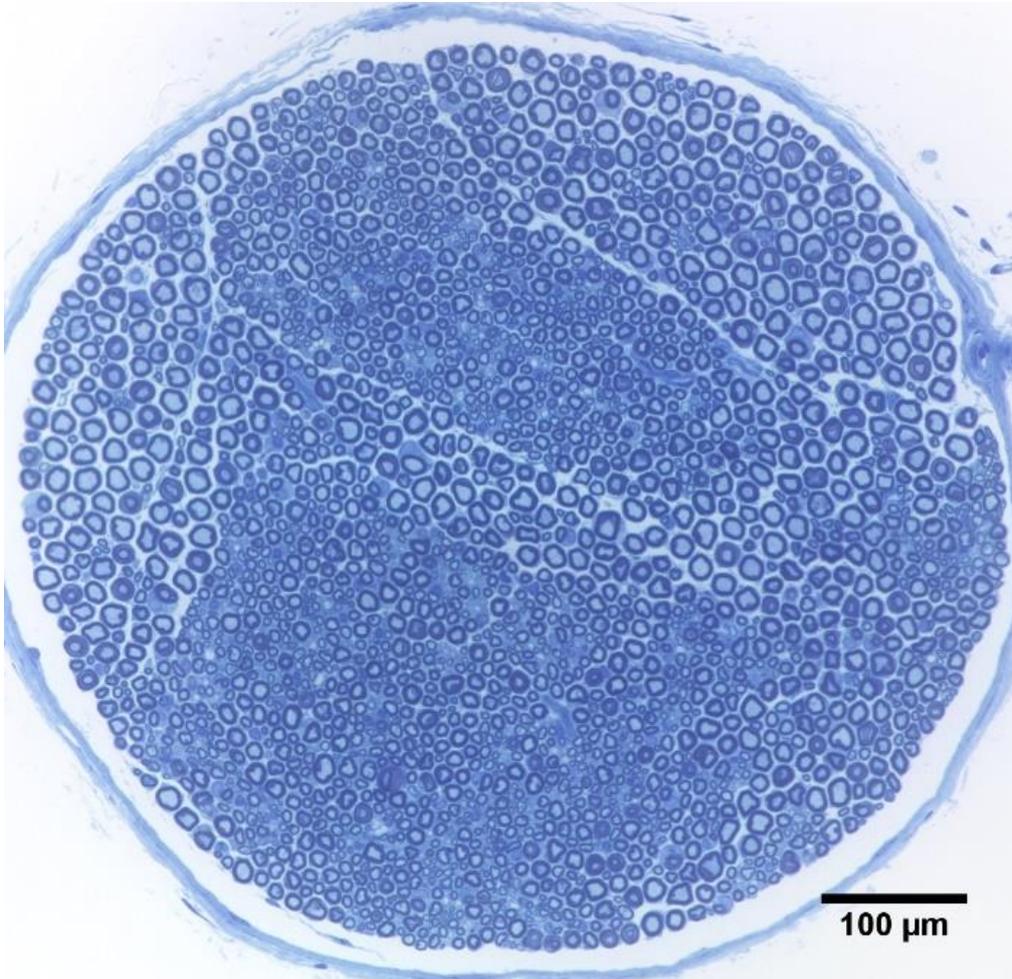
**Abbildung 4 Versuchsaufbau Auswertung der Interessensregionen**

A zeigt eine Überlagerung der vom Tracer sichtbar gemachten Perikarya der Motoneurone des N. tibialis (blau) und Iba1+ Mikroglia (rot). Es wurden ROI um die Perikarya gebildet (B) und gespeichert. Anschließend wurden diese ROI in das Bild der Iba1+ Mikroglia eingefügt (C) und die Fläche der Iba1+ Pixel mit Hilfe eines Schwellenwertes gefiltert (D). Abschließend konnten die Bildpunkte innerhalb der ROI quantifiziert werden.

### 3.8.3 Quantifizierung von Axonen im N. tibialis

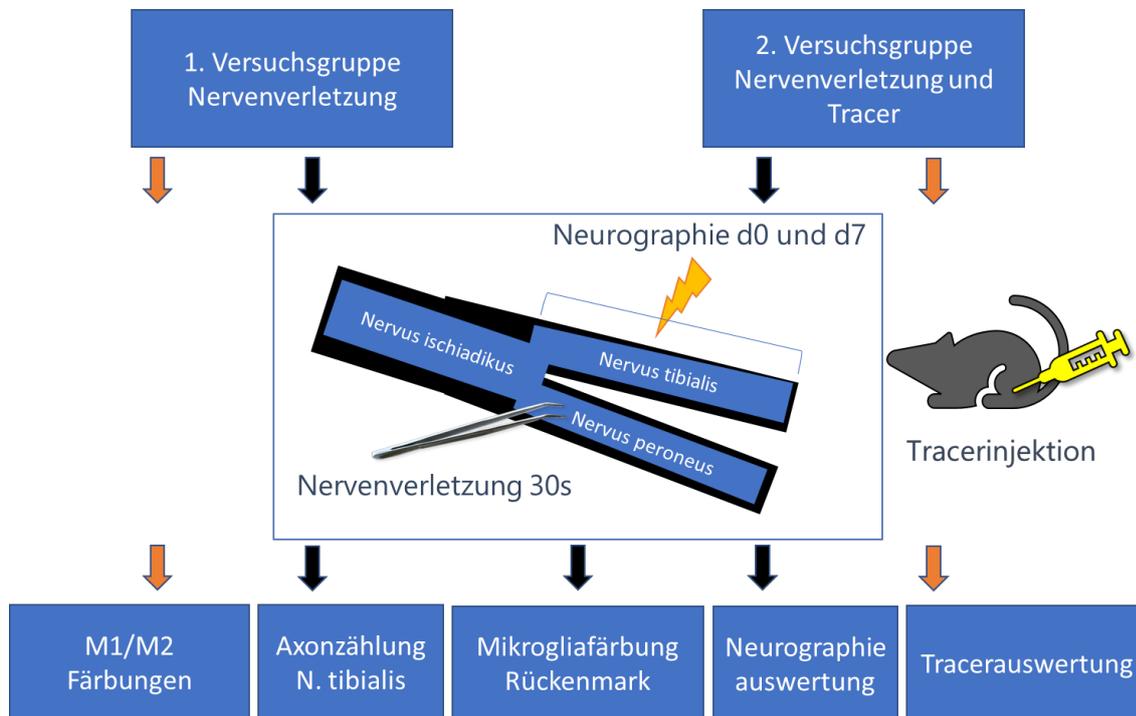
Mit dem Mikroskop BZ 9000 (Keyence) wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Nervenschnitte in 20-facher Vergrößerung erstellt. Die Schnitte wurden in ImageJ zur Auszählung der Axone eingefügt. Das von Toluidinblau (Sigma) angefärbte Myelin umrundete die Axone und es wurden die Kreise gezählt, die keinen schwarzen Inhalt

zeigten (degenerierte Axone). **Abb. 5** zeigt einen repräsentativen Semidünnschnitt des N. tibialis.



**Abbildung 5** Repräsentativer Schnitt des N. tibialis

### 3.9 Schematischer Versuchsaufbau



**Abbildung 6 Versuchsskizze**

Eine Versuchsgruppe entspricht: WT n=5, SOD1<sup>G93A</sup> präsymptomatisch n=5, SOD1<sup>G93A</sup> symptomatisch n=5 und je 2-3 Kontrollen. Beide Versuchsgruppen wurden operiert. Es wurden neurographische Messungen durchgeführt, die Axone ausgezählt und Mikrogliafärbungen mit Iba1 erstellt. Dabei wurden beide Versuchsgruppen als eine gemeinsame ausgewertet (schwarze Pfeile). Lediglich der zweiten Versuchsgruppe wurde vor der Nervenverletzung ein Tracer injiziert (orange Pfeile rechts). Von Rückenmarksschnitten der ersten Versuchsgruppe wurden Immunfluoreszenzfärbungen von iNOS und Arginase 1 (M1/M2) angefertigt (orange Pfeile links).

### 3.10 Statistische Analyse

Alle Daten der Experimente wurden verblindet und randomisiert erhoben und ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.) analysiert. Es wurden t-Tests durchgeführt, um die Mittelwerte zweier Gruppen miteinander zu vergleichen. Ergebnisse mit mehr als zwei Gruppen wurden mit der ANOVA verglichen. Bei einer vorhandenen Normalverteilung wurde die

gewöhnliche einfaktorielle ANOVA und bei nicht vorhandener Normalverteilung die einfaktorielle ANOVA mit post-hoc-Test nach Sidak verwendet.

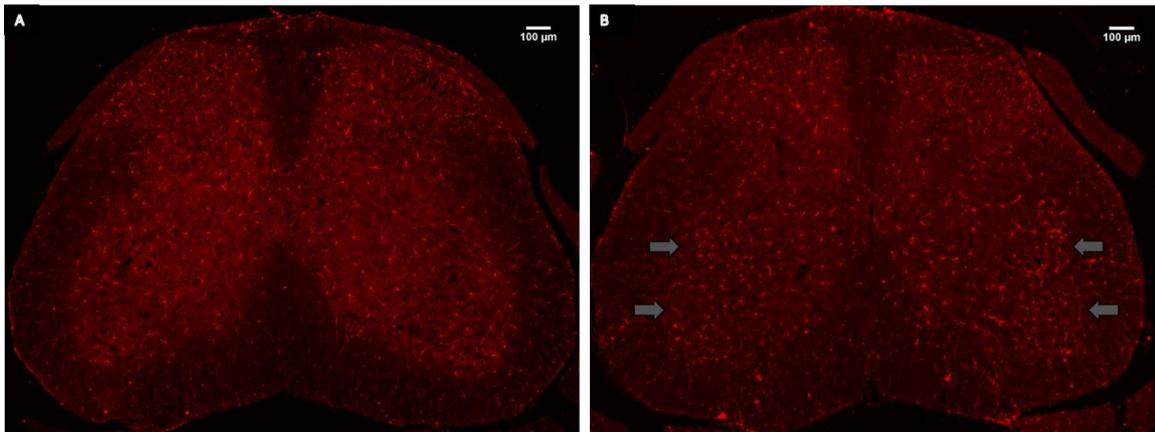
Der Unterschied der Gruppen wurde als statistisch signifikant gewertet, wenn der p-Wert unter 0,05 war (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Mikroglia im Rückenmark in Wildtyp- und SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen

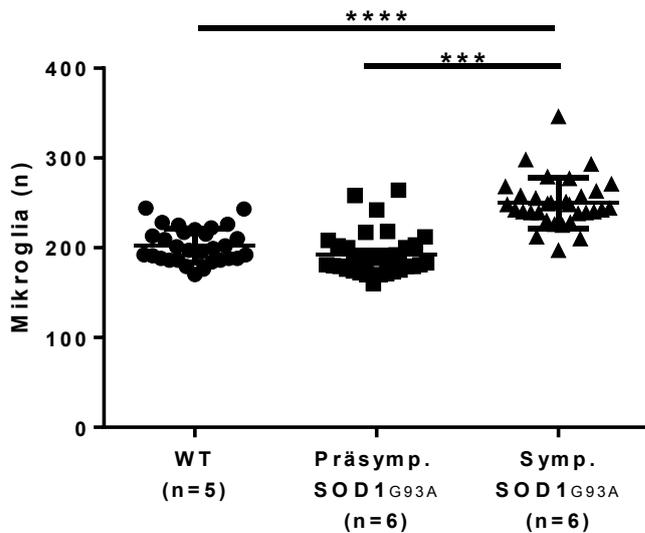
Symptomatische SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse zeigten im Vergleich zu präsymptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen und Wildtypmäusen vermehrt Iba1+ Mikroglia im Vorderhorn des Rückenmarks. In den Vorderhörnern beider Seiten konnte diese Akkumulation beobachtet werden (siehe **Abb. 7** graue Pfeile).

**Abb. 8** zeigt die Quantifizierung der Mikroglia in Kontrolltieren des Wildtyps, sowie in präsymptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> und symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Tieren. Symptomatische SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse zeigen eine höhere Anzahl an Mikroglia im Rückenmark im Vergleich zu Wildtyp und präsymptomatischen Tieren (Mittelwerte: Symptomatisch.;  $250,1 \pm 5,0$ , Wildtyp;  $202,4 \pm 3,5$ , Präsymptomatisch;  $192,5 \pm 4,2$ ).



**Abbildung 7 Immunhistochemische Färbung gegen Iba1 von Rückenmarksschnitten (L4/L5) unverletzter Kontrolltiere**

(A) Rückenmarksquerschnitt von unverletzten Wildtyptieren. Man erkennt Iba1+ Mikroglia in der grauen und weißen Substanz des Rückenmarks. (B) Rückenmarksquerschnitt von symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen zeigt im Vergleich zu den Wildtyptieren eine deutliche Vermehrung von Iba1+ Mikroglia. Diese zeigt sich vor allem in den Vorderhörnern, wo die Perikarya der Motoneurone lokalisiert sind (graue Pfeile).



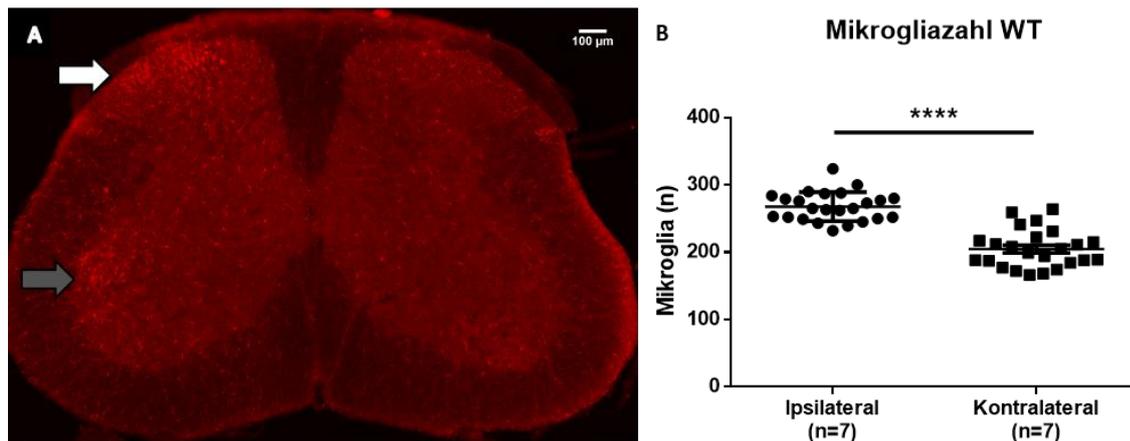
**Abbildung 8 Quantifizierung von Mikroglia im Rückenmark (L4/L5) von Wildtyptieren, präsymptomatischen und symptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Mäusen**

Wildtyptiere und präsymptomatische SOD1<sub>G93A</sub> Tiere zeigen signifikant weniger Iba1+ Mikroglia als symptomatische SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse.

Statistische Analyse der einfaktoriellen ANOVA mit post-hoc-Test nach Sidak. Fehlerbalken: Mittlerer Standardfehler (SEM), \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

#### 4.2 Mikroglia im Rückenmark von Wildtypmäusen nach Nervenverletzung

Sieben Tage nach Durchführung der Verletzung des N. peroneus zeigte sich im lumbalen Rückenmark (L4/L5) auf der ipsilateralen Seite, wo die Perikarya der Motoneurone des N. tibialis und N. peroneus lokalisiert sind, bei Mäusen des Wildtyps eine signifikant höhere Anzahl der Iba1 + Mikroglia im Vergleich zur kontralateralen Seite ( $267,8 \pm 4,4$  vs.  $204,9 \pm 5,7$ ) (**Abb. 9**). Diese konnten sowohl im Vorderhorn als auch im Hinterhorn des Rückenmarks detektiert werden (**Abb. 9 A**, graue und weiße Pfeile).



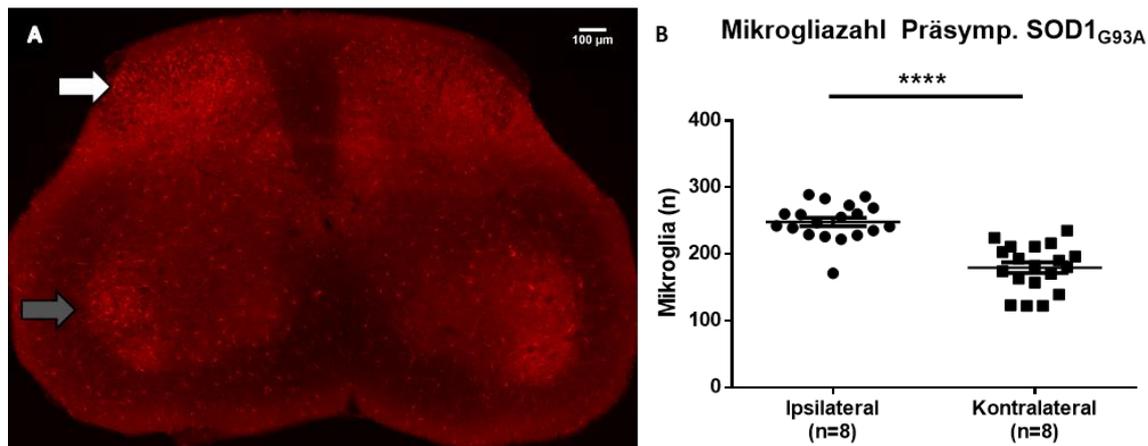
### Abbildung 9 Akkumulation von Mikroglia im Rückenmark von Wildtypmäusen sieben Tage nach Verletzung des N. peroneus

(A) Repräsentatives Bild eines Rückenmarksquerschnitts (L4/L5) einer Wildtypmaus sieben Tage nach Verletzung des N. peroneus. Auf der ipsilateralen Seite erkennt man eine Akkumulation von Iba1 + Mikroglia (in rot) im Hinterhorn (weißer Pfeil) und im Vorderhorn (grauer Pfeil). Ipsilateral konnten signifikant mehr Mikroglia detektiert werden als auf der kontralateralen Seite.

(B) Quantifizierung der Mikrogliazahl der ipsilateralen und kontralateralen Seite, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM), \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  (t-Test für verbundene Stichproben).

### 4.3 Mikroglia im Rückenmark von präsymptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen nach Nervenverletzung

Bei präsymptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen zeigte sich eine Mikrogliaakkumulation sieben Tage nach Verletzung des N. peroneus. Im lumbalen Rückenmark (L4/L5) waren signifikant mehr Iba1 + Mikroglia als auf der kontralateralen Seite ( $248,1 \pm 6,4$  vs.  $179,5 \pm 8,0$ ) nachweisbar (**Abb. 10**). Diese Akkumulation konnte sowohl im Vorderhorn als auch im Hinterhorn des Rückenmarks detektiert werden (**Abb. 10 A**, graue und weiße Pfeile).



**Abbildung 10 Akkumulation von Mikroglia im Rückenmark von präsymptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Mäusen sieben Tage nach Verletzung des N. peroneus**

(A) Repräsentatives Bild eines Rückenmarksquerschnittes (L4/L5) einer präsymptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Maus sieben Tage nach Verletzung des N. peroneus. Auf der ipsilateralen Seite erkennt man eine Akkumulation von Iba1 + Mikroglia (in rot) im Hinterhorn (weißer Pfeil) und im Vorderhorn (grauer Pfeil). Ipsilateral konnten signifikant mehr Mikroglia detektiert werden als auf der kontralateralen Seite.

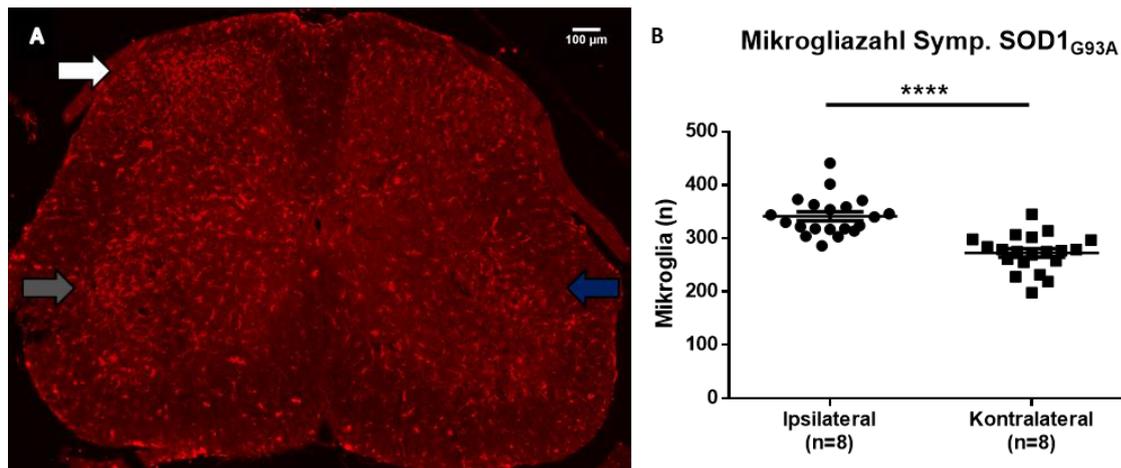
(B) Quantifizierung der Mikrogliazahl der ipsilateralen und kontralateralen Seite, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM), \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  (t-Test für verbundene Stichproben).

#### 4.4 Mikroglia im Rückenmark von symptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Mäusen nach Nervenverletzung

Symptomatische SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse zeigen mehr Mikroglia im Rückenmark im Vergleich zu Wildtyptieren und präsymptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Mäusen (siehe 4.1).

Sieben Tage nach Verletzung des N. peroneus ist diese bereits präinterventionell erhöhte Anzahl auf der ipsilateralen Seite nochmals höher. Symptomatische SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse zeigten im lumbalen Rückenmark eine erhöhte Anzahl von Iba1 + Mikroglia (Abb. 11). Sowohl im Vorderhorn (grauer Pfeil) als auch im Hinterhorn (weißer Pfeil) der ipsilateralen Seite konnte eine Akkumulation von Mikroglia detektiert werden. Es waren signifikant ( $p < 0,0001$ ) mehr Iba1 + Mikroglia als auf der kontralateralen Seite ( $341,5 \pm 8,2$  vs.  $272,6 \pm 7,8$ ).

Auf der unverletzten, kontralateralen Seite zeigte sich weiterhin die bereits präinterventionell erhöhte Zahl von Mikroglia (Abb. 11 A, blauer Pfeil). Diese war bei allen symptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Mäusen zu erkennen.



**Abbildung 11 Akkumulation von Mikroglia im Rückenmark von symptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Mäusen sieben Tage nach Verletzung des N. peroneus**

(A) Repräsentatives Bild eines Rückenmarksquerschnitts (L4/L5) einer symptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Maus sieben Tage nach Verletzung des N. peroneus. Auf der ipsilateralen Seite erkennt man eine Akkumulation von Iba1 + Mikroglia (in rot) im Hinterhorn (weißer Pfeil) und im Vorderhorn (grauer Pfeil). Ipsilateral konnten signifikant mehr Mikroglia detektiert werden als auf der kontralateralen Seite.

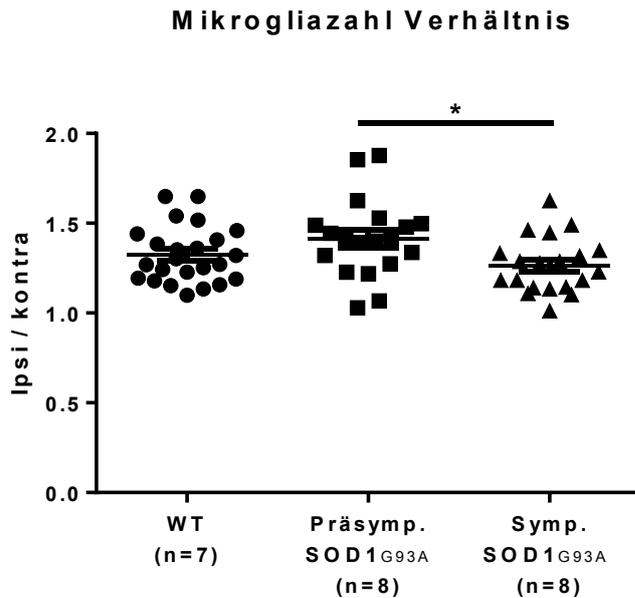
Auf der unverletzten, kontralateralen Seite konnte eine erhöhte Anzahl von Mikroglia detektiert werden (blauer Pfeil).

(B) Quantifizierung der Mikrogliazahl der ipsilateralen und kontralateralen Seite, Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM), \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  (t-Test für verbundene Stichproben).

#### 4.5 Symptomatische SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse mit verringerter Mikrogliaakkumulation

Es wurde ein Quotient aus der Mikrogliazahl der ipsilateralen Seite und der kontralateralen Seite nach Nervenverletzung gebildet, um die Akkumulation auch relativ analysieren zu können (Abb. 12). Dieser Quotient war bei den symptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Mäusen ( $1,265 \pm 0,03$ ) signifikant geringer als der der präsymptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse ( $1,416 \pm 0,05$ ). Wildtypmäusen zeigten auch ein höheres Verhältnis der Aktivierung ( $1,323 \pm 0,03$ ), dieser Unterschied war nicht signifikant zu den symptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Tieren.

Dieser Quotient macht deutlich, dass die Mikrogliaakkumulation von symptomatischen Mäusen im Verhältnis zur kontralateralen Seite, welche als Ausgangsmenge vor der Verletzung angesehen werden kann, deutlich geringer ausfällt als bei präsymptomatischen und Wildtypmäusen.



**Abbildung 12 Verhältnis der Mikrogliazahl ipsi- zu kontralateral sieben Tage nach Nervenverletzung**

Der Quotient aus Mikroglia ipsilateral und kontralateral war bei den symptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Mäusen ( $1,265 \pm 0,03$ ) signifikant geringer als bei den präsymptomatischen Mäusen ( $1,416 \pm 0,05$ ). Wildtyptiere zeigten einen nicht signifikant höheren Quotienten der Mikrogliazahl ( $1,323 \pm 0,03$ ).

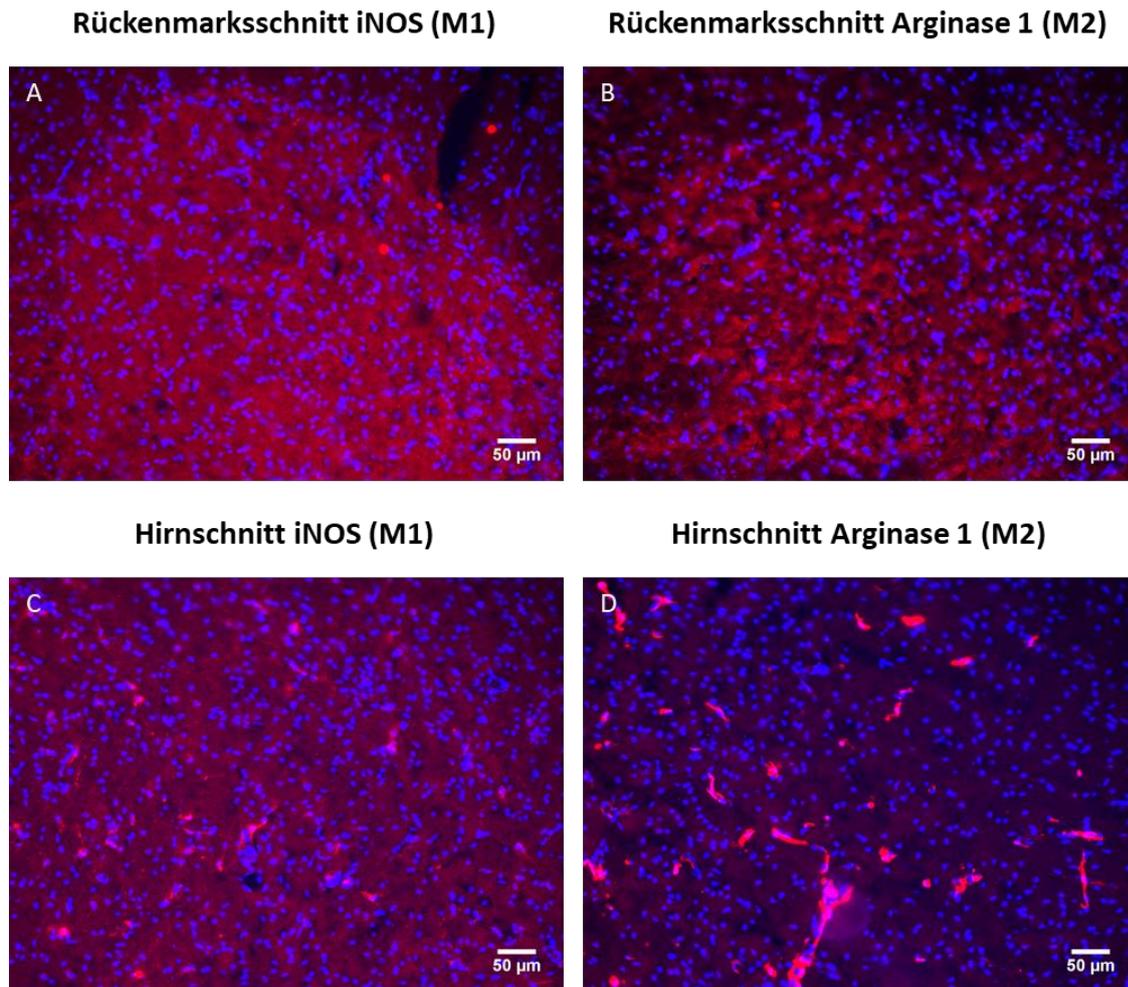
Statistische Analyse der gewöhnlichen einfaktoriellen ANOVA. Fehlerbalken: Mittlerer Standardfehler (SEM).

#### 4.6 Immunhistochemische Untersuchungen der Polarisierung von Mikroglia

Um die Funktion der Mikrogliaakkumulation zu charakterisieren, wurden immunhistochemische Färbungen mit spezifischen Antikörpern gegen die Polarisierungen M1 (iNOS) und M2 (Arginase 1) angefertigt.

Obwohl sich die gefärbten Schnitte auf Höhe der betroffenen Perikarya im Rückenmark befanden, konnte sieben Tage nach Nervenverletzung des N. peroneus keine Färbung mit einem dieser Marker beobachtet werden.

Als Positivkontrolle dienten Hirnschnitte einer Versuchsreihe nach induziertem fokalem ischämischen Schlaganfall (Hamzei Taj et al., 2016a; Hamzei Taj et al., 2016b). In diesen mitgefärbten Schnitten konnten sowohl iNOS (M1) als auch Arginase 1 (M2) angefärbt werden (unveröffentlichte Daten der AG Neuroimaging und Neuroengineering des experimentellen Schlaganfalls von Dr. Markus Aswendt).



### Abbildung 13 M1/M2 Färbung von Rückenmarksschnitten und Positivkontrollen

Abbildung A und B zeigen Färbungen von iNOS (M1) und Arginase 1 (M2) im Rückenmark sieben Tage nach Nervenverletzung des N. peroneus. Es konnte keine Polarisierung von Mikroglia nachgewiesen werden. Hirnschnitte einer Maus nach induziertem fokalem ischämischen Schlaganfall zeigten als Positivkontrolle iNOS (C) und Arginase 1 (D) positive Perikarya. Die Zellkerne sind mit Hoechst 33342 blau gefärbt, 20-fache Vergrößerung.

Zusammenfassend konnte eine Aktivierung von Mikroglia in allen drei Versuchsgruppen in Form einer Akkumulation im Vorderhorn nachgewiesen werden. Symptomatische SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse wiesen zusätzlich eine größere Anzahl an Iba1 positiven Mikroglia auf als die anderen beiden Gruppen.

Im Vorderhorn aller drei Versuchsgruppen konnten keine Polarisierung (M1/M2) von Mikroglia sieben Tage nach Nervenverletzung angefärbt werden.

## 4.7 Ergebnisse der Tracer-Experimente

Um die Motoneurone des N. tibialis zu visualisieren, wurde ein Tracer (FluoroGold) verwendet, der in den M. gastrocnemius injiziert wurde. Dieser Tracer wird über retrograden axonalen Transport in das Rückenmark transportiert und emittiert dort ein immunfluoreszentes Signal in den Nervenkernen des N. tibialis. Der Tracer wurde in Kontrolltiere und in die Versuchstiere unmittelbar nach der Nervenverletzung des N. peroneus injiziert.

Es wurde, wie in **Kapitel 3.8.2** beschrieben, eine Analyse von Interessensregionen (ROI) um das fluoreszierende Signal des Tracers im N. tibialis durchgeführt. Das Immunfluoreszenzsignal der Iba1 + Mikroglia wurde auf eine Pixelanzahl innerhalb der ROI von ImageJ umgerechnet. Nachfolgend wurden drei unterschiedlich große Radien (ROI klein, mittel, groß) um die Perikarya des N. tibialis gebildet.

## 4.8 Quantifizierung der Mikroglia um die Perikarya des N. tibialis

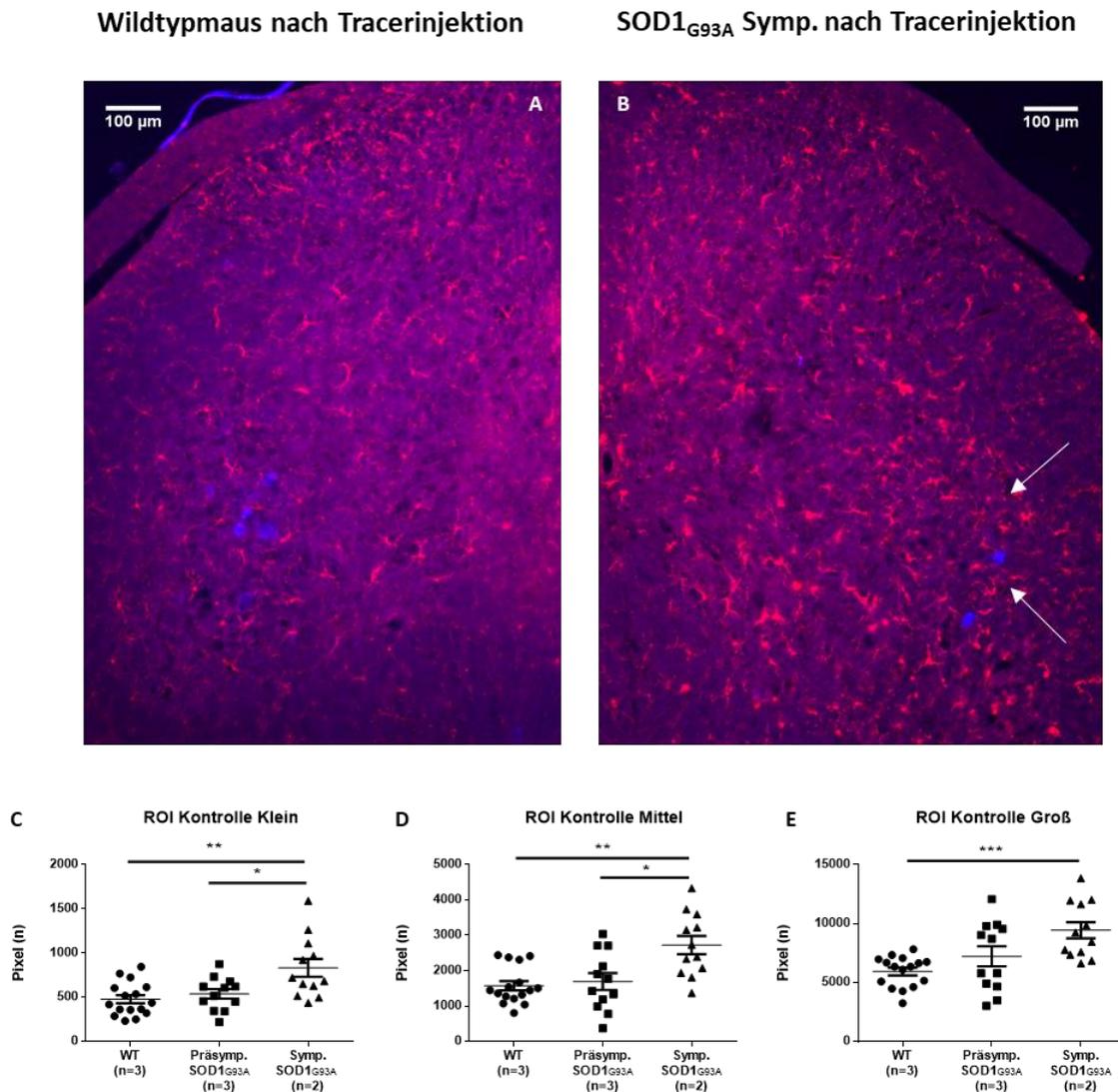
Wildtypmäusen, präsymptomatischen und symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen wurde ohne vorherige Nervenverletzung der Tracer FluoroGold in den M. gastrocnemius injiziert. Nach sieben Tagen wurden Iba1+ Pixel innerhalb der ROI des lumbalen Rückenmarks zwischen den Gruppen verglichen.

Es zeigte sich eine signifikant höherer Pixelwert in allen drei ROI des N. tibialis der symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Tiere im Vergleich zu den Wildtyptieren (**Abb. 14 C-E**). Dies höhere Pixelanzahl entspricht einer vermehrten Akkumulation von Mikroglia. Im Vergleich zu den präsymptomatischen zeigten die symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse in der kleinen und mittleren ROI eine signifikant höhere Mikrogliazahl. Die Mittelwerte sind der **Tabelle 12** zu entnehmen.

	WT	Präsymptomatisch	Symptomatisch
ROI klein	477,6 ± 47,3	538,2 ± 53,7	831,5 ± 100,6
ROI mittel	1577 ± 131,4	1696 ± 240,3	2723 ± 257,7
ROI groß	5930 ± 323,8	7221 ± 850,5	9426 ± 693,3

**Tabelle 12 Mittelwerte und mittlere Standardfehler Iba1+ Pixel nach Tracerinjektion, ROI = Interessensregion**

In **Abb. 14** ist ein repräsentativer Rückenmarksschnitt einer Wildtypmaus (**A**) der linken Seite und der rechten Seite einer symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Maus (**B**) mit der Mikrogliaakkumulation um die mit FluoroGold gefärbten Motoneurone zu beobachten. Man erkennt, dass eine symptomatische SOD1<sup>G93A</sup> Maus eine deutlich erhöhte Mikrogliaakkumulation aufweist als die Wildtypmaus. Im Vorderhorn ist dieser Unterschied in den Kontrolltieren am größten (**Abb. 14 B** weiße Pfeile).



**Abbildung 14 Rückenmarksquerschnitte (L4/L5) mit Färbung von Iba1+ Mikroglia und Tracersignal in Motoneuronen des N. tibialis**

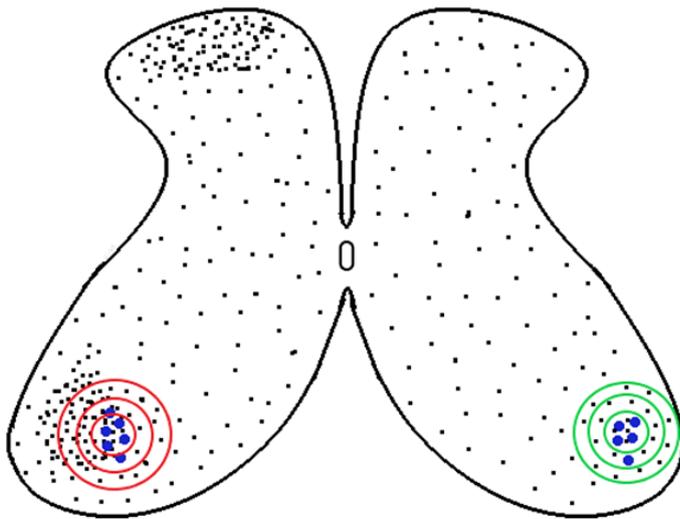
(A) zeigt eine immunfluoreszente Färbung gegen Iba1 und mit FluoroGold markierte Motoneurone des N. tibialis eines Rückenmarks der linken Seite einer Wildtypmaus und (B) ein repräsentatives Bild des rechten Rückenmarks einer symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Maus. Zu erkennen ist die höhere Mikrogliazahl der SOD1<sup>G93A</sup> Maus, die Mikrogliaakkumulation im Vorderhorn (weiße Pfeile) und die in blau angefärbten Motoneurone des N. tibialis.

Die symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Tiere zeigten signifikant mehr Mikroglia in der Region der Perikarya des N. tibialis als die Wildtypmäuse (C-E). Außerdem waren signifikant mehr Mikroglia in der kleinen und mittleren ROI im Vergleich zu präsymptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen zu detektieren (C, D).

Dargestellte Abbildungen zeigen Ergebnisse des gewöhnlichen einfaktoriellen ANOVA (C und E) und der einfaktoriellen ANOVA mit post-hoc-Test nach Sidak (D). Fehlerbalken: Mittlerer Standardfehler (SEM).

#### 4.9 Mikrogliaakkumulation um die Motoneurone des N. tibialis nach Verletzung des N. peroneus

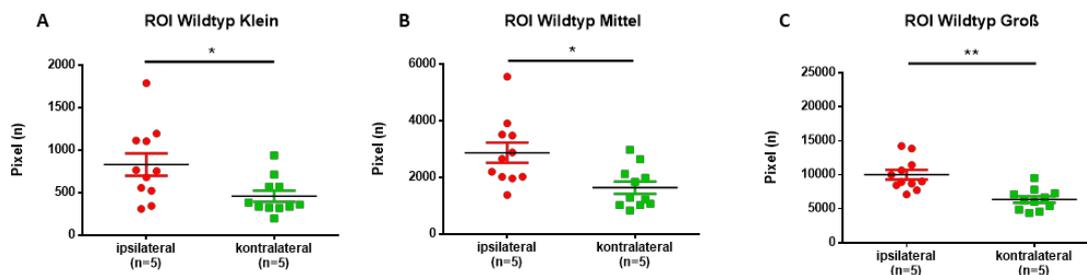
Bei operierten Versuchstieren wurden die ROI der ipsilateralen mit der jeweiligen kontralateralen Seite verglichen (**Abb. 15**). Es wurden Rückenmarksschnitte ausgewählt, die sowohl eine deutliches Tracersignal im Vorderhorn beider Seiten als auch eine ipsilaterale Mikrogliaakkumulation aufwiesen.



**Abbildung 15 Versuchsskizze Rückenmark nach Nervenverletzung und Tracerinjektion**

Die Abbildung zeigt eine schematische Skizze des Rückenmarks. Die Motoneurone des N. tibialis, die mit dem Tracer FluoroGold angefärbt wurden, sind blau. Mikroglia sind als schwarze Punkte gekennzeichnet. Die Interessensregionen (ROI) der ipsilateralen Seite (Klein, Mittel, Groß) sind als rote Kreise um die Nervenkerne gezeichnet. Die grünen Kreise markieren die ROI der kontralateralen Seite.

Wildtypiere wiesen ipsilateral der Läsion in allen drei Interessensregionen eine erhöhte Anzahl von Mikroglia auf als auf der kontralateralen Seite (ROI klein:  $830,8 \pm 132,1$  vs.  $458,7 \pm 65,4$ , ROI mittel:  $2875 \pm 357,7$  vs.  $1642 \pm 217,7$ , ROI groß:  $10.017 \pm 706,9$  vs.  $6359 \pm 467,5$ ) (**Abb. 16**).

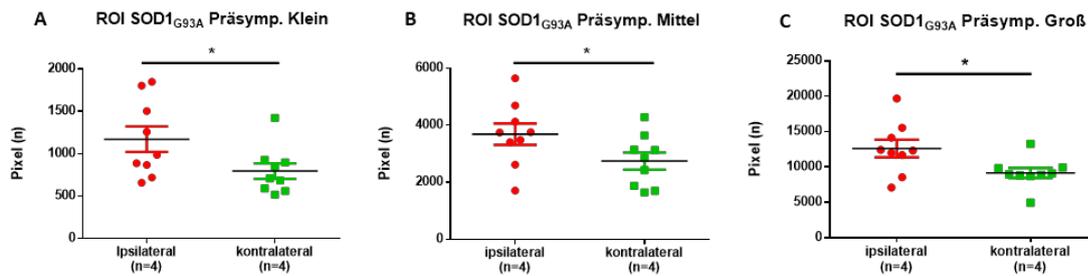


**Abbildung 16 Quantifizierung der Mikroglia innerhalb der ROI des N. tibialis von Wildtypmäusen nach Nervenverletzung des N. peroneus**

Wildtypmäuse zeigten sieben Tage nach Nervenverletzung des N. peroneus ipsilateral (rot) eine signifikant erhöhte Anzahl Iba1+ Pixel, Mikroglia entsprechend, um die Nervenkerne des unverletzten N tibialis als kontralateral (grün) ( $p < 0,05$ ).

Statistische Analyse anhand des t-Tests für verbundene Stichproben. Fehlerbalken: Mittlerer Standardfehler (SEM).

Auch bei präsymptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen waren, unmittelbar um die vom Tracer gefärbten Neurone (ROI klein), sowie bei den größeren ROIs (mittel und groß), auf der ipsilateralen Seite mehr Pixel nachweisbar als auf der kontralateralen Seite (ROI klein:  $1171 \pm 151,3$  vs.  $796,8 \pm 92,6$ , ROI mittel:  $3687 \pm 377,1$  vs.  $2745 \pm 303,8$ , ROI groß:  $12.606 \pm 1231$  vs.  $9160 \pm 707,4$ ) (**Abb. 17**).



### Abbildung 17 Quantifizierung der Mikroglia innerhalb der ROI des N. tibialis präsymptomatischer SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse nach Nervenverletzung des N. peroneus

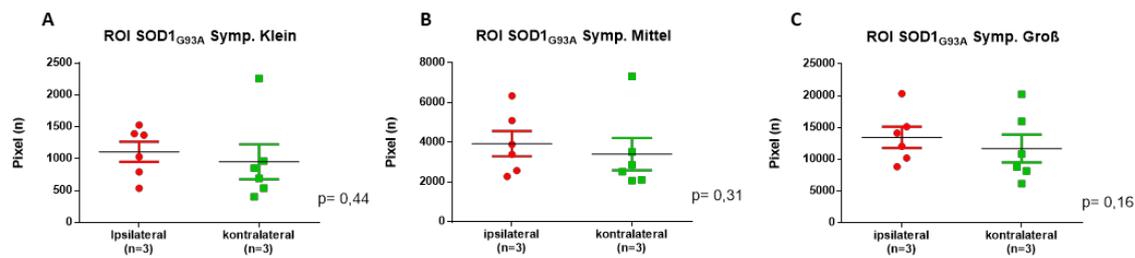
Präsymptomatische SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse war sieben Tage nach Nervenverletzung des N. peroneus ipsilateral (rot) eine signifikant erhöhte Anzahl Iba1+ Pixel, Mikroglia entsprechend, um die Nervenkerne des unverletzten N tibialis im Vergleich zur kontralateralen Seite (grün) nachzuweisen ( $p < 0,05$ ).

Statistische Analyse anhand des t-Tests für verbundene Stichproben. Fehlerbalken: Mittlerer Standardfehler (SEM).

Dies bedeutet, dass sich in unmittelbarer Nähe der Motoneurone des N. tibialis von Wildtypmäusen und präsymptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Mäusen ipsilateral signifikant mehr Mikroglia befinden, obwohl der N. peroneus und nicht der N. tibialis verletzt wurde.

### 4.10 Mikrogliaakkumulation um die Motoneurone des N. tibialis symptomatischer SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse nach Verletzung des N. peroneus

Symptomatische SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse mit Nervenverletzung zeigten keine erhöhte Pixelanzahl innerhalb der ROI im Vergleich zur kontralateralen Seite. Dabei waren die Mikroglia innerhalb der ROI der kontralateralen Seite, wie schon in **Kapitel 4.8** beschrieben, erhöht und somit die Differenz zur jeweiligen ipsilateralen Seite verringert (ROI klein:  $1110 \pm 159,1$  vs.  $953,3 \pm 273,9$ , ROI mittel:  $3932 \pm 633,3$  vs.  $3403 \pm 814,3$ , ROI groß:  $13.453 \pm 1679$  vs.  $11.694 \pm 2185$ ) (**Abb. 18**)



## Abbildung 18 Quantifizierung der Mikroglia innerhalb der ROI des N. tibialis symptomatischer SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse nach Nervenverletzung des N. peroneus

Symptomatische SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse zeigten sieben Tage nach Nervenverletzung des N. peroneus ipsilateral (rot) keine erhöhte Anzahl Iba1+ Pixel, Mikroglia entsprechend, um die Nervenkerne des unverletzten N. tibialis als kontralateral (grün). Bei keiner der ROI war ein signifikanter Unterschied auszumachen. Statistische Analyse anhand des t-Tests für verbundene Stichproben. Fehlerbalken: Mittlerer Standardfehler (SEM).

Zusammenfassend lässt sich sagen, Wildtypmäuse und präsymptomatische SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse nach Verletzung des N. peroneus eine erhöhte Anzahl von Mikroglia ipsilateral um die Motoneurone des unverletzten N. tibialis aufweisen. Dies konnte durch den Vergleich mit der kontralateralen Seite, die signifikant niedrigere Signale aufwies, nachgewiesen werden.

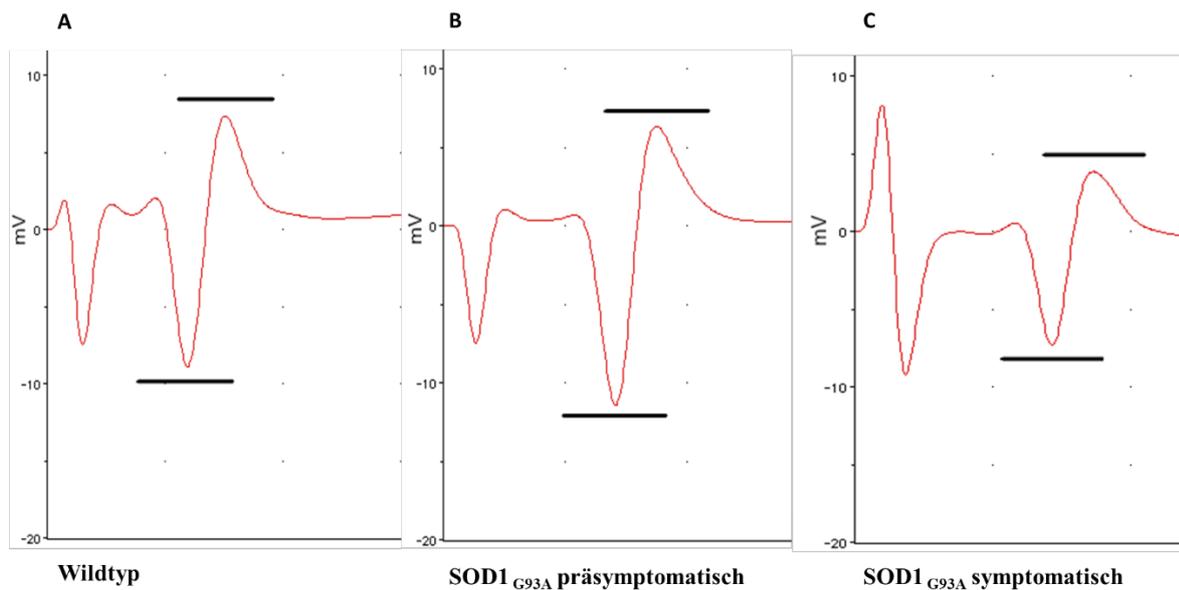
Bei symptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Mäusen waren die Iba1 + Mikroglia in gleicher Weise auf beiden Seiten innerhalb der ROI erhöht. Dies unterstreicht auch der Vergleich der jeweiligen Kontrolltiere mit alleiniger Tracerinjektion. Symptomatische SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse zeigten eine höhere Mikrogliaakkumulation um die Motoneurone innerhalb der ROI im Vergleich zu präsymptomatischen und Wildtypmäusen.

### 4.11 Ergebnisse der Elektroneurographie

Es wurden elektroneurographische Messungen am N. tibialis durchgeführt. Hierbei wurden die Neurographen des N. tibialis beider Hinterläufe der Wildtypmäuse, der präsymptomatischen und der symptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse vor der Operation als Ausgangswerte ausgewertet.

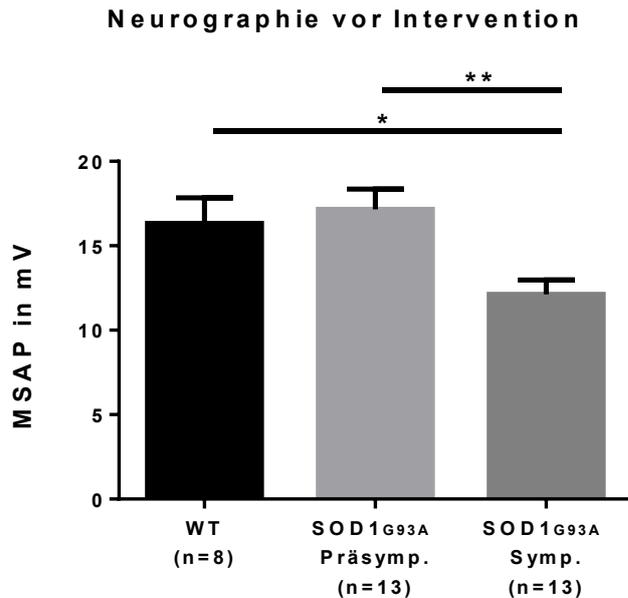
Repräsentative Bilder zeigen die Mittelwerte der Amplitude des Muskelsummenaktionspotentials (MSAP) an Tag 0 (**Abb. 19**). Symptomatische

SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse weisen eine geringere Amplitude auf (ca. 12 mV (C), im Vergleich zu Wildtypmäusen  $\approx$  16 mV (A) und präsymptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen  $\approx$  17 mV (B)). Die Peak-to-Peak Amplitude der MSAP von symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen ist signifikant geringer als die der präsymptomatischen und Wildtypmäuse (Abb. 20).



### Abbildung 19 Repräsentative Neurographen

Repräsentative Neurographen der Muskelsummenaktionspotentiale (MSAP) jeder Gruppe vor der Operation. Es erfolgte eine Neurographie des N. tibialis und die Peak-to-Peak Amplitude (in mV) wurde ausgemessen (schwarze Balken). Die Werte der Wildtyp, präsymptomatischen und symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse wurden miteinander korreliert. WT  $\approx$  16 mV (A), präsymptomatisch  $\approx$  17 mV (B), symptomatisch  $\approx$  12 mV (C).



#### Abbildung 20 Neurographie des N. tibialis vor Intervention

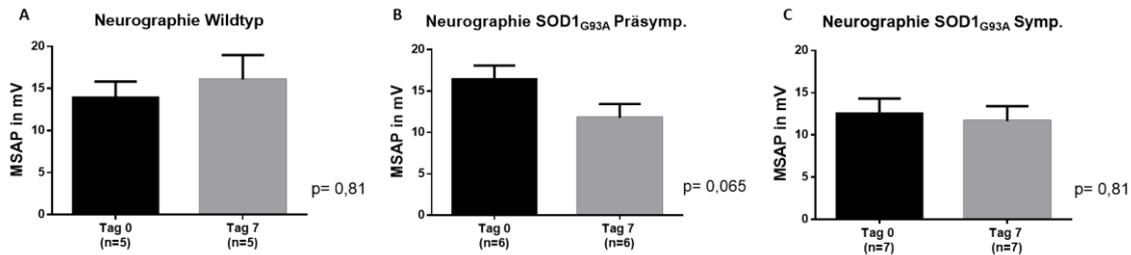
Neurographie von Versuchstieren und Kontrollen des N. tibialis (ipsi- und kontralaterale Hinterläufe) vor Nervenverletzung. Symptomatische SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse zeigen signifikant niedrigere Amplitude des MSAP im Vergleich zu präsymptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Mäusen und Wildtypmäusen.

Statistische Analysen wurden anhand einer einfaktoriellen ANOVA mit post-hoc-Test nach Sidak erhoben. Fehlerbalken: Mittlerer Standardfehler (SEM), \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

#### 4.12 Neurographie des N. tibialis sieben Tage nach Läsion des N. peroneus

Um eine Auswirkung der Peroneusläsion auf den unverletzten N. tibialis zu untersuchen, wurde zusätzlich zur Ausgangsneurographie vor der Operation (**Abb. 20**), eine weitere Messung sieben Tage nach Peroneusläsion durchgeführt. Wie in **Abb. 21** gezeigt, wurde keine Reduktion des MSAP weder bei Wildtypmäusen noch bei SOD1<sub>G93A</sub> Tieren gemessen. Lediglich bei der präsymptomatischen Gruppe lässt sich eine (nicht signifikante) Tendenz zu niedrigeren Amplituden feststellen ( $p = 0,065$ ).

Mäuse bei denen zusätzlich der Tracer (siehe 4.7) injiziert wurde, wiesen keinen Unterschied in der Amplitude zu den Tieren ohne diesen Eingriff aus. Es wurden daher die Versuchsgruppen mit und ohne zusätzliche Tracerinjektion gemeinsam ausgewertet



### Abbildung 21 Neurographie des N. tibialis sieben Tage nach Läsion des N. peroneus

Gezeigt sind die Graphen der Peak-to-Peak Amplitude des MSAP vor der Operation (Tag 0) und 7 Tage danach. Der ipsilaterale, linke Hinterlauf wurde hierfür neurographiert. Bei keiner der drei Versuchstiergruppen konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Statistische Analysen wurden anhand eines t-Tests für gepaarte Stichproben mit Wilcoxon Test erhoben. Fehlerbalken: Mittlerer Standardfehler (SEM).

Zusammenfassend waren die Amplituden des MSAP bei symptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> signifikant niedriger im Vergleich zu den anderen beiden Versuchstiergruppen, allerdings konnte kein Unterschied in der Amplitude des MSAPs des N. tibialis detektiert werden, nachdem der N. peroneus verletzt wurde.

#### 4.13 Quantifizierung der Axone des N. tibialis vor Intervention

Von, mit Toluidinblau gefärbten Nervenschnitten wurde die Anzahl der Axone des N. tibialis vor Intervention bei Wildtyptieren, symptomatischen und präsymptomatischen SOD1<sub>G93A</sub> Mäusen quantifiziert.

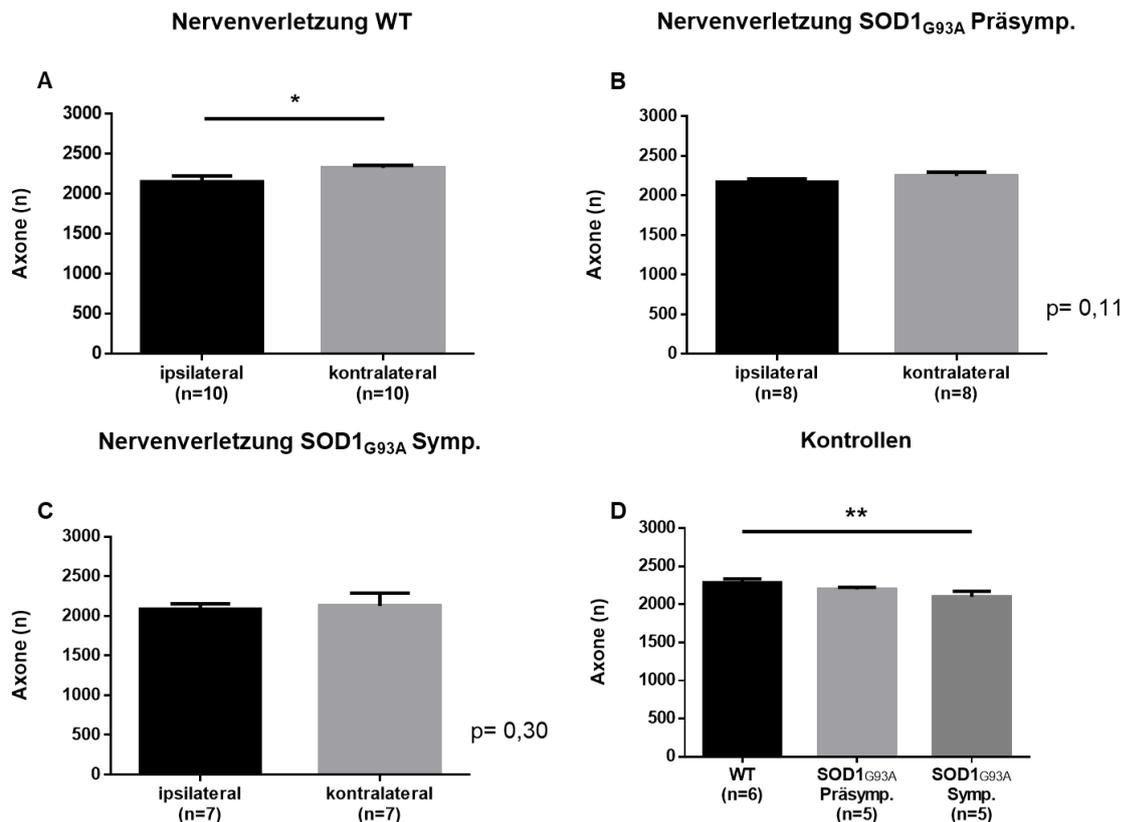
Im präsymptomatischen Stadium wurde eine tendenziell verringerte Menge an Axonen festgestellt, im symptomatischen Stadium war eine Verminderung der Axonzahl im Vergleich zu den Wildtypmäusen auszumachen (**Abb. 22 D**). (Mittelwerte: WT; 2286 ± 50,4, Präsymptomatisch.; 2196 ± 27,5, Symptomatisch; 2099 ± 24,1).

#### 4.14 Quantifizierung der Axone des N. tibialis nach Verletzung des N. peroneus

Die Anzahl der Axone des N. tibialis wurde sieben Tage nach der Operation quantifiziert (**Abb. 22**). Hierbei wurde die ipsilaterale Seite mit der kontralateralen verglichen. Die

Nn. tibialis der Wildtypmäuse zeigten eine signifikant verringerte Axonzahl auf der Seite des verletzten N. tibialis (ipsilateral:  $2155 \pm 71,5$  vs. kontralateral:  $2326 \pm 32,3$ ).

Sowohl die präsymptomatischen als auch die symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Tiere zeigten lediglich eine nicht signifikante Tendenz (Präsymptomatisch:  $2169 \pm 41,6$  vs.  $2248 \pm 47,1$ ; Symptomatisch:  $2085 \pm 68,5$  vs.  $2126 \pm 61,7$ ).



**Abbildung 22 Quantitative Auswertung der Axone des N. tibialis**

Vorliegende Abbildungen zeigen die Axonzahl des N. tibialis auf der operierten (ipsilateral) und der nicht operierten, kontralateralen Seite (A-C). Es zeigt sich eine signifikante Verringerung der Axone von Wildtypmäusen nach Nervenverletzung auf der ipsilateralen Seite (A). Kein Unterschied konnte bei SOD1<sup>G93A</sup> Tieren verschiedener Krankheitsstadien festgestellt werden (B, C). In Abbildung D wurden die Axonzahlen der Kontrolltiere gegeneinander aufgetragen. Symptomatische SOD1<sup>G93A</sup> Tiere hatten vor Intervention signifikant weniger Axone im N. tibialis als Wildtypiere.

Statistische Analyse anhand des t-Tests für verbundene Stichproben (A-C) und der gewöhnlichen einfaktoriellen ANOVA (D). Fehlerbalken: Mittlerer Standardfehler (SEM), \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

## 5. Diskussion

### 5.1. Mikrogliaakkumulation im Rückenmark nach einer peripheren Nervenverletzung des N. peroneus

Die Rolle der Mikroglia im Rückenmark nach peripherer Nervenverletzung wird kontrovers diskutiert. Im Hinterhorn des Rückenmarks wird eine Mikrogliaakkumulation mit der Induktion von neuropathischem Schmerz in Zusammenhang gebracht (Lim et al., 2017; Ren & Dubner, 2010; Scholz & Woolf, 2007; Jin et al., 2003). Mikroglia und Monozyten unterstützen hierbei die Transformation eines akuten zu einem chronischen Schmerz durch erhöhte Synthese und Sekretion von Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  (Peng et al., 2016; Krakauer, 2004). Allerdings wird betont, dass eine große Divergenz der Mikrogliaantwort nach einer peripheren Nervenverletzung beobachtet wird (Peluffo et al., 2015; Calvo & Bennett, 2012).

Zu der Funktion der Mikroglia im Vorderhorn gibt es widersprüchliche Befunde. Mallat und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Mikroglia *in vitro*, nachdem sie mit Lipopolysacchariden aktiviert wurden, neuronale Wachstumsfaktoren (NGF) produzieren. Diese Neurotrophine fördern die Reifung und das Überleben von Motoneuronen (Mallat, et al., 1989). Auf der anderen Seite sind Mikroglia für das Abbau synaptischer Verbindungen der geschädigten Motoneurone zuständig, dem „synaptic stripping“ (Rotterman et al., 2019; Aldskogius, 2011).

Wir konnten durch die Verletzung des N. peroneus eine Mikrogliaakkumulation auf Rückenmarksebene hervorrufen und wollten untersuchen, ob diese Mikroglia die Motoneurone des unverletzten N. tibialis, die ebenfalls in diesem Rückenmarkssegment lokalisiert sind, schädigen. Innerhalb des ZNS beschränkten wir uns auf das Rückenmark, da bereits Zhang und Mitarbeiter zeigen konnten, dass es bei der Verletzung des N. peroneus zu einer Mikrogliaakkumulation im Vorderhorn kommt, die nicht auf höhere Regionen, z.B. Schmerzzentren oder den Kortex, übergreifen (Zhang et al., 2008). Die Annahme, dass es ausschließlich in dem Rückenmarkssegment zu einer Schädigung kommt, wird u.a. durch eine Studie von Kobbert und Thanos gestützt: An Ratten wurde der N. ischiadicus an vier verschiedenen Stellen verletzt. Im Rückenmark wurde die Lokalisation und das Ausmaß der Mikrogliaakkumulation untersucht. Beschrieben wird, dass es nur in der korrespondierenden, verletzten Region der Nervenkerne zu dieser Akkumulation kommt (Cullheim et al., 2007; Kobbert & Thanos, 2000; Aldskogius et al.,

1999). In einer in vivo Studie an Mäusen wurde sieben Tage nach Nervenverletzung des N. ischiadicus Immunfluoreszenzfärbungen des Rückenmarks für Mikroglia und eine für die Somata von Neuronen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Mikroglia nur zu den Somata der Neurone betroffener Regionen migrieren. NGF, welches hinzugegeben wurde, beeinflusste dabei die Mikrogliaakkumulation nicht (De Luca et al., 2016). Außerdem zeigt sich kein Unterschied in der Zahl der Mikroglia, die um die Motoneurone lokalisiert waren, wenn man den N. ischiadicus und den N. tibialis durchtrennt (Rotterman et al., 2019).

Mit Hilfe eines etablierten Verfahrens durch Tracerinjektion (FluoroGold) (Köbber et al., 2000; Wessendorf, 1991; Schmued & Fallon, 1986) konnten wir die Somata des unverletzten N. tibialis markieren. Es zeigte sich, dass bei Wildtypmäusen die Mikroglia nicht nur um die Motoneurone des verletzten N. peroneus akkumulieren, sondern auch im Bereich des benachbarten N. tibialis. Diese Experimente beweisen, dass zumindest eine räumliche Nähe als Grundvoraussetzung für eine Interaktion dieser beiden Zelltypen besteht. Wie es zu dieser Akkumulation von Mikroglia kommt ist nicht vollständig geklärt. Befunde aus Modellen einer Aktivierung der Mikroglia im Hinterhorn implizieren, dass Chemokine hierbei beteiligt sind. Eines dieser Chemokine ist CX3CL1, welches von Neuronen nach einer peripheren Nervenverletzung ausgeschüttet wird (Li et al., 2015). Der korrespondierende Rezeptor hierfür ist CX3CR1, der u.a. auf Mikroglia exprimiert wird. Nach einer Verletzung des peripheren Nervs wird dieser Rezeptor in Mikroglia im Dorsalhorn hochreguliert (Clark & Malcangio, 2014).

Es gibt Befunde die postulieren, dass diese Mikroglia auch protektiv und proregenerativ wirken: Aktivierte T-Zellen formen Aggregate mit aktivierten, phagozytotischen Mikroglia, die neuronale Zellreste aufsammeln. Diese Rekrutierung und Aggregation ist auf die verletzte Region beschränkt. Es wird postuliert, dass dies einen schnellen und spezifisch protektiven Mechanismus darstellt. Dadurch kann zwischen physiologischer, natürlicher Apoptose und Zelltod durch einen äußeren Faktor unterscheiden werden (Raivich et al., 2018). Eine exzessive Ausschüttung von Zytokinen kann jedoch eine Dysregulation der eigentlich protektiven Funktion von Mikroglia im zentralen Nervensystem verursachen. Diese Dysregulation kann in Neurotoxizität münden: Neuronale Zellen, welche genauso sensitiv auf Zytokine reagieren, werden angegriffen (Hanisch, 2002).

## 5.2 Mikrogliaakkumulation im Rückenmark präsymptomatischer und symptomatischer SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse

Die ALS zeichnet sich durch einen Verlust von Motoneuronen und deren Axonen aus. Dies fängt im präsymptomatischen Stadium an und schreitet mit zunehmendem Krankheitsverlauf voran. Es lässt sich sowohl im Tiermodell, als auch bei Menschen nachweisen (Fischer et al., 2004). Mikroglia spielen in Krankheitsentstehung und Verlauf der ALS eine zentrale Rolle. Sie nehmen sowohl protektive als auch toxische Rollen ein und werden kontrovers diskutiert (Kang et al., 2007; Boillée et al., 2006).

Wir konnten eine Mikrogliaakkumulation im Vorderhorn der SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse nur bei symptomatischen Kontrollmäusen auf immunhistochemischer Ebene nachweisen. Im präsymptomatischen Stadium zeigte sich dies nicht. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche erst ab dem 80. Lebensjahr eine Akkumulation im Vorderhorn (Lewis et al., 2014; Alexianu et al., 2001), manche erst ab dem 100. Lebensjahr von SOD1<sup>G93A</sup> mutierten Mäusen (Hall, et al., 1998) entdeckten. Im Gegensatz dazu wurde aber der Nachweis von Mikroglia markern bei Versuchen mit SOD1 transgenen Ratten in Form von CD11b schon im präsymptomatischem Stadium in erhöhtem Maß nachgewiesen (Graber et al., 2010). CD11b ist neben anderen Markern wie z.B. Iba1 und CD68 sehr sensitiv zum Nachweis von Mikroglia (Hoogland et al., 2015; Wojtera et al., 2012).

Wir haben anschließend eine Nervenverletzung in Mäusen durchgeführt und konnten eine Akkumulation von Mikroglia ipsilateral im Rückenmark beobachten. Sowohl bei präsymptomatischen ( $248,1 \pm 6,4$  vs.  $179,5 \pm 8,0$ ) als auch bei symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Tieren ( $341,5 \pm 8,2$  vs.  $272,6 \pm 7,8$ ) konnte dies repliziert werden. Bei symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Tieren konnte eine signifikante Akkumulation von Mikroglia auf Basis der krankheitsbedingten, bereits erhöhten Menge an Mikroglia nachgewiesen werden.

Neueste Erkenntnisse zeigen, dass SOD1<sup>G93A</sup> transgene Ratten sich nach Verletzung des N. ischiadicus langsamer erholen als Wildtypiere. Eine Nervenverletzung und die anschließende Mikrogliose sorgt dafür, dass diese Tiere eine verlangsamte und insuffiziente Regeneration zeigen, welches in einem schnelleren Krankheitsfortschritt und verringertem Überleben mündet (Schram et al., 2019). Es wurde eine um die Hälfte reduzierte Innervation der Motoneurone beobachtet, welche nur bei SOD1<sup>G93A</sup> Ratten mit

peripherer Nervenverletzung des N. ischiadicus und nicht bei verletzten Wildtypmäusen oder unverletzten SOD1<sup>G93A</sup> Ratten zu beobachten war.

Beers und seine Arbeitsgruppe haben mit einem SOD1 transgenen Mausmodell herausgefunden, dass SOD1 mutierte Mikroglia neurotoxischer sind als Wildtypmikroglia (Beers, et al., 2008). Zusätzlich verursacht eine progressive Toxizität von Zytokinen und einer vermehrte Ausschüttung dieser weitere Schäden mit fortschreitendem Krankheitsverlauf (Lyon et al., 2019; Tortarolo et al., 2017).

Diese Beobachtungen und unsere Versuchsergebnisse legen nahe, dass Mikroglia inflammatorisch und dementsprechend neurotoxisch auf SOD1<sup>G93A</sup> mutierte Tiere wirken und eine Nervenverletzung dies potenzieren könnte.

### **5.3 Präsymptomatische SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse mit erhöhter Mikrogliaakkumulation nach Nervenverletzung**

Dibaj und Mitarbeiter konnten zeigen, dass schon 60 Minuten nach einer Nervenverletzung eine erhöhte Migration von Mikroglia zu ipsilateralen Seitensträngen der betroffenen Rückenmarksabschnitte zu erkennen war. Nur im präsymptomatischen Stadium von SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen konnte mithilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops in vivo eine erhöhte phagozytotische Aktivität am Nerv und Seitenstrang erfasst werden (Dibaj et al., 2011). Diese Mikrogliareaktion war im Vergleich zu Wildtypmäusen erhöht und im symptomatischen Stadium deutlich verringert. Wir konnten einen ähnlichen Effekt beobachten: Im Vergleich zu den Wildtypmäusen ( $1,323 \pm 0,03$ ) war das Verhältnis der Mikrogliaakkumulation ipsilateral zu kontralateral bei präsymptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen nicht signifikant erhöht ( $1,416 \pm 0,05$ ). Im Vergleich zu symptomatische SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse ( $1,265 \pm 0,03$ ) zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Verhältnisses. Dies legt eine erhöhte Vulnerabilität der Nerven auf axonalen und inflammatorischen Schaden nahe, der durch eine erhöhte krankheitsbedingte Zytokinausschüttung im präsymptomatischen Stadium erklärt werden kann. Ein Essay von inflammatorischen Proteinen von SOD1 Mäusen im präsymptomatischen Stadium zeigte eine gesteigerte Genexpression von neurodegenerativen Faktoren (Yoshihara et al., 2002).

Dies könnte auch unsere weiteren Ergebnisse erklären, welche zeigen, dass nur SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse im präsymptomatischen Stadium eine erhöhte Ansammlung von Mikroglia um die

Somata des unverletzten N. tibialis zeigten. Die krankheitsbedingte Inflammation der Motoneurone des N. tibialis bei symptomatischen Tieren könnte die Akkumulation von Mikroglia geringer erscheinen lassen, als es bei Wildtyptieren und präsymptomatischen Tieren der Fall ist. Minimale Unterschiede könnten dadurch maskiert werden. Da wir bei symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen eine durch das Krankheitsstadium bedingte verringerte Rekrutierung auf einer erhöhten Basis von Mikroglia erwarten, lässt sich dies mit unseren Ergebnissen vereinbaren.

Wir postulieren, dass die Mikrogliaakkumulation nach Nervenverletzung, welche über die Motoneurone des N. peroneus hinausgeht und die bei SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen beobachtete vermehrte Mikrogliose einen negativen Einfluss auf betroffene Nervenkerne haben könnte. So zeigt sich eine erhöhte Apoptoserate der Neurone nach peripherer Nervenverletzung bei SOD1 Mäusen (Reaume et al., 1996). Außerdem steht eine erhöhte Mikrogliazahl in Verbindung mit einem Verlust der synaptischen Verbindungen in Motoneuronen und einem früheren Krankheitsausbruch von SOD1<sup>G93A</sup> Ratten (Schram et al., 2020).

#### **5.4 Polarisierung von Mikroglia**

Um die Funktion der vorhandenen Mikroglia aufzuschlüsseln, wurden Färbungen von inflammatorischen (M1) und antiinflammatorischen (M2) Polarisierungen im Rückenmark etabliert. Bei Wildtypmäusen lassen sich sieben Tage nach Nervenverletzung keine M1 oder M2 auf immunhistochemischer Basis anfärben. Es waren weder in der Nähe der Motoneurone noch im Hinterhorn iNOS<sup>+</sup> oder Arginase 1<sup>+</sup> Mikroglia zu detektieren. Eine Positivkontrolle zeigte mit gleicher Färbung ein M1 und M2 Signal, dies macht einen Methodenfehler unwahrscheinlich.

Unsere Ergebnisse widersprechen vorangegangenen Erkenntnissen. Im Spinalganglion (DRG) und Hinterhorn wurden Polarisierungen schon ein bis zwei Tage nach peripherer Nervenverletzung immunfluoreszent angefärbt (Komori et al., 2011), was gegen eine zu kurze Zeitspanne unseres Versuchsaufbaus spricht. Im Hinterhorn und DRG spielen M2 bei der Inhibierung von neuronalem Schaden und neurogenem Schmerz eine Rolle (Komori et al., 2011). Im Vorderhorn wurden noch keine Beobachtungen zur Funktion der einzelnen Polarisierungen von Mikroglia nach peripherer Nervenverletzung gemacht.

Bei präsymptomatischen, >65 Tage alten und symptomatischen, >110 Tage alten SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen konnten wir ebenfalls keine Polarisierungen von Mikroglia anfärben. Dies war bei weder bei Kontrolltieren noch bei operierten Tieren möglich.

Zhang und Mitarbeiter etablierten bereits eine immunfluoreszente Färbung von Rückenmarksschnitten symptomatischer SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen. Eine signifikante Erhöhung der M1 im Vorderhorn wurde sowohl bei 90 als auch 120 Tage alten Mäusen festgestellt. Auch M2 Mikroglia wurden angefärbt, hierbei war der Peak bei Tag 90 und verringerte sich bei Tag 120 (Zhang et al., 2018).

Über die Auswirkung der Polarisierung im Rückenmark wird kontrovers diskutiert. Anfangs scheinen in der ALS protektive M2 Mikroglia den Krankheitsverlauf zu verlangsamen. In späteren Krankheitsstadien schütten M1-proinflammatorische Mikroglia zytotoxische Signale aus, was durch neuronalen Stress zum Fortschreiten der Motoneurondegeneration und der Krankheit führten (Lewis et al., 2014; Chiu et al., 2013; Henkel et al., 2009). Zusätzlich wurden Mikroglia entdeckt, welche weder M1 noch M2 zuzuordnen waren und einer ALS-spezifischen Klasse zugesprochen werden (Chiu et al., 2013) oder als weitere neurotoxische Polarisierungen benannt werden (Ohgomori et al., 2016).

## **5.5 Elektrophysiologische Untersuchungen**

Um die Funktionalität der motorischen Nervenfasern zu quantifizieren, ist die Messung der Peak-to-Peak Amplitude (in mV) der Muskelsummenaktionspotentiale (MSAP) ein gängiger Parameter (Pollari, et al., 2018).

Diese Arbeit zeigt, dass sieben Tage nach der Nervenverletzung des N. peroneus keine Veränderung des Muskelsummenaktionspotentials (MSAP) des N. tibialis bei allen drei Mausreihen auftritt.

Es gibt diverse Studien, die zeigen, dass sich nach Nervenverletzung das MSAP am selbigen Nerv verringert (Glat et al., 2016; Serafín et al., 2010; Robinson, 2000). Auch beim N. peroneus tritt dies auf (Cheng et al., 2014). Es gibt jedoch keine Studien dazu, ob der benachbarte, unverletzte Nerv beeinflusst wird.

Trotz erster Degenerationen der Motoneurone, die bereits im präsymptomatischen Stadium zu beobachten sind, treten sowohl beim Menschen als auch im Mausmodell eine Abnahme der MSAP erst im symptomatischen Stadium der ALS auf (Li et al., 2016;

Shefner et al., 2001; Azzouz et al., 1997; Dantes et al., 1991). Die normwertige Anzahl von Motoneuronen bei acht Wochen (56d) alten SOD1 Mäusen und eine signifikante Motoneurondegeneration bei 16 Wochen alten Mäuse (128d) (Mohajeri, et al., 1998) deckt sich mit unseren Ergebnissen: Kontrolltiere symptomatischer SOD1<sub>G93A</sub> Mäuse wiesen eine signifikante Verringerung der MSAP im Vergleich zu präsymptomatischen und Wildtypmäusen auf (Symptomatisch ca. 12 mV im Vergleich zu WT ca. 16 mV und Präsymptomatisch ca. 17 mV).

Die Neurographie konnte im SOD1 Mausmodell mit der Überlebenszeit korreliert werden, was die Bedeutung dieser Methodik hervorhebt (Mancuso, et al., 2014). Auf die Limitierung der Neurographie und die große Streubreite der Werte wurde allerdings in vielen Fachliteraturen hingewiesen (Vogel, 2018; Bischoff et al., 2016; Korte et al., 2011). Obwohl wir die Methodik so weit wie möglich standardisierten, ließen sich Einflüsse durch Temperatur, Tageszeit und Diversität des Tiers, wie Haltung, Vitalität und Ableitungsort nicht vollständig ausschließen. Die bei uns aufgetretene hohe Streubreite der Ergebnisse kann zusätzlich durch operative Unterschiede, wie die Lage der Ableitungselektroden zum Nerv und der individuelle Heilungsprozess sieben Tage nach der Operation schwanken.

Vorangegangene Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass nach Nervenverletzung des N. ischiadicus die Regeneration der Axone und des MSAP bei SOD1<sub>G93A</sub> Tieren (Präsymptomatisch und Symptomatisch) langsamer voranschritt als bei Wildtypmäusen. Dieser Unterschied wurde aber erst ab mehr als zehn Tagen nach Nervenverletzung in der Neurographie deutlich (Joshi et al., 2019). Falls es aber zu einer sekundären, durch eine zentrale Mikrogliose hervorgerufene Degeneration kommt, ist davon auszugehen, dass diese auf symptomatische SOD<sub>G93A</sub> Mäuse die gravierendsten Auswirkungen haben wird. Denn mit dem Fortschreiten der Krankheit nimmt die Regenerationsfähigkeit nach peripherer Nervenverletzung deutlich ab und regenerative Zytokine werden vermindert ausgeschüttet (Kotulska et al., 2006; Kilic et al., 2004; Ilieva et al., 2003).

## **5.6 Die Nervenverletzung führt zu einer axonalen Degeneration des N. tibialis von Wildtypmäusen, allerdings nicht von SOD1<sub>G93A</sub> Mäusen**

Axonale Degeneration nach Nervenverletzung über die Wallersche Degeneration ist hinreichend bekannt. Auf Grund einer Nervenverletzung kommt es zur Degeneration der

Axone und deren Abbau (Wanner et al., 2017; Lee et al., 2016; Bauder et al., 2012; Hiraga et al., 2006). Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte dies nach Nervenverletzung von Wildtyp- und SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen repliziert werden (Joshi et al., 2019). Bei einer Durchtrennung des Nervs, die mit der verträglicheren Verletzung, der mechanischen Komprimierung des Nervs, vergleichbar ist, kommt es zu diversen zellulären Schäden, neuronaler Apoptose und Muskelatrophie. Der molekulare Mechanismus ist noch nicht hinreichend bekannt (Scheib et al., 2013).

Wir haben den N. peroneus verletzt und postulieren, dass der oxidative Stress und die Mikrogliose im Rückenmark eine inflammatorische Reaktion hervorrufen, welche die Motoneurone des N. tibialis beschädigen und dies anhand eines axonalen Schadens in der Peripherie sichtbar wird. Wildtypmäuse zeigten eine signifikant verringerte Axonanzahl in Querschnitten des N. tibialis im Vergleich zur kontralateralen Seite (Mittelwerte: Ipsilateral:  $2155 \pm 71,5$  vs. Kontralateral:  $2326 \pm 32,3$ ). Dies könnte ein indirekter Hinweis für eine sekundäre Nervenschädigung sein. Präsymptomatische und symptomatische SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse zeigten jedoch keine signifikant verringerte Axonzahl des N. tibialis im Querschnitt. Eine nicht signifikante Tendenz lässt sich aber in beiden Krankheitsstadien erkennen (Präsymptomatisch:  $2169 \pm 41,6$  vs.  $2248 \pm 47,1$ ; Symptomatisch:  $2085 \pm 68,5$  vs.  $2126 \pm 61,7$ ). Bei beiden Gruppen wurden ipsilateral weniger Axone des N. tibialis gezählt als kontralateral. Die bereits vorhandene Motoneurondegeneration von symptomatischen SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen könnte die Effekte der Operation auch maskieren. So wiesen unverletzte symptomatische SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse signifikant weniger Axone im N. tibialis auf als nicht operierte Wildtypiere (WT;  $2286 \pm 50,4$  vs. Symptomatisch;  $2099 \pm 24,1$ ).

Auf Grundlage der vorhandenen Literatur würden wir eine erhöhte Vulnerabilität der Axone von SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen nach Nervenverletzung erwarten. Ein bereits im präsymptomatischen Stadium gestörter retrograder Signaltransport beeinflusst den Krankheitsfortschritt der ALS negativ. Zusätzlich zeigen SOD1<sup>G93A</sup> Mäuse Axonopathien, welche durch oxidativen Stress hervorgerufen werden. Ein vergleichbarer oxidativer Stress wird durch die Nervenverletzung hervorgerufen (Adalbert et al., 2013; Fischer et al., 2012). Die Regeneration und Remyelinisierung sind krankheitsbedingt nach axonaler Nervenverletzung gestört (Deng et al., 2018). Da wir aber den unverletzten Nerv untersucht haben und erwarten, dass die Mikrogliose im Rückenmark zu sekundären Schäden an den Axonen führt, können nur Vermutungen auf Basis der gestörten axonalen

Transports- und Regenerationsfähigkeit bei SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen angestellt werden. So wiesen Mariotti und Mitarbeiter eine erhöhte Anfälligkeit der Motoneurone des N. facialis nach peripherer Nervenverletzung bei SOD1<sup>G93A</sup> Tieren nach. Sie zeigten, dass es bei diesem Tiermodell zu einer erhöhten phagozytotischen Aktivität kommt (Mariotti et al., 2000). Ein verlängerter Abstand zwischen Nervenverletzung und Perfusion der Mäuse könnte diese Tendenz verdeutlichen, denn bei SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen zeigt sich einen Monat nach Nervenverletzung eine erhöhte Anfälligkeit der Motoneurone im Vergleich zu Wildtypmäusen (Mariotti et al., 2002).

Basierend auf den Ergebnissen ist anzunehmen, dass sowohl die Nervenverletzung am N. peroneus als auch die fortschreitende Krankheit in SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen einen Einfluss auf die Axonzahl im N. tibialis haben und diese sich eventuell gegenseitig beeinflussen.

## 5.7 Methodische Limitierung

Die Aktivierung von Mikroglia im Vorderhorn des Rückenmarks nach peripherer Nervenverletzung ist hinreichend etabliert (Rotterman et al., 2019; Berg et al., 2013; He et al., 1996). Das mechanische Komprimieren des Nervs stellt hierbei im Gegensatz zur vollständigen Durchtrennung eine schonendere Methodik dar, die vergleichbare Effekte auslöst (Aldskogius et al., 2011). Obwohl durch diverse Maßnahmen versucht wurde den Tracer im Muskel zu halten und der M. gastrocnemius als Kennmuskel für den N. tibialis sehr geeignet ist (Mohan et al., 2014), lässt sich nicht vollständig ausschließen, dass der Tracer in einen benachbarten Muskel injiziert wurde oder ausgelaufen ist (Bácskai et al., 2013). Dies hätte zur Konsequenz, dass der Tracer zu anderen Motoneuronen retrograd transportiert würde und dadurch die Ergebnisse beeinflusst.

Auch die durch die Operation hervorgerufene Muskelverletzung führt über eine toxische Signalkaskade dazu, dass die veränderte Skelettmuskelaktivität die Aktivität der Motoneurone beeinträchtigt (Dobrowolny et al., 2015). Da es bei der Operation zu einer Muskelverletzung kam, ist nicht auszuschließen, dass die Verletzung zu einem neuronalen Schaden führt. Bei kontrollierten Mäusen „sham operation“ ohne periphere Nervenverletzung von De Luca und Mitarbeiter zeigten sich jedoch keine auffälligen Parameter (De Luca et al., 2016).

Die Einstellungen des *threshold* mit dem Programm ImageJ wurde nach häufigem Wiederholen weitestgehend standardisiert. Es wurden hierbei überbelichtete Schnitte

oder färbungsbedingte Artefakte in der Auszählung ausgeschlossen. Eine individuelle Abweichung der Mikrogliasignale lässt sich aber nicht vollständig ausschließen. Automatisierte *threshold* scheinen gute Ergebnisse zu liefern (Healy et al., 2018), aber wir konnten feststellen, dass die Signale und Helligkeiten nicht zu vereinheitlichen sind und haben den *threshold* individuell auf jedes Bild angepasst.

Da bei allen Auswertungen die ipsi- mit der korrespondierenden kontralateralen Seite als verbundene Stichprobe verglichen wurden, lassen sich individuelle, konstitutionelle und geschlechtsbedingte Unterschiede ausschließen. Auch die unterschiedlich starken Signale in den verschiedenen Ansätzen der Immunfluoreszenzfärbung wurden dadurch vereinheitlicht. Auf der anderen Seite lassen sich Fehler in der manuellen Auszählung von Axonen und Mikroglia nicht ausschließen, auch wenn diese verblindet durchgeführt wurden.

Abschließend lassen sich keine allgemeinen Aussagen von dem SOD1<sup>G93A</sup> Tiermodell auf die ALS übertragen, da es sich um Tiermodell handelt, welches der familiären ALS ähnlich ist, aber alleine innerhalb der verschiedenen Knockoutmodelle, wie SOD1<sup>G93A</sup> und SOD1<sup>H46R</sup> schon große Unterschiede in Überlebenszeit und Krankheitsverlauf sichtbar werden (Pan et al., 2012).

## 5.8 Zukunftsperspektiven

Es wurde nach sieben Tage die Mikrogliose im Rückenmark untersucht. Dies könnte ein zu kurzer Zeitraum gewesen sein, bis es zu einer überwiegenden Polarisierung zu M1 Mikroglia und entsprechend zu oxidativem Stress kommt, der umliegende Motoneurone beeinflusst. Im dorsalen Horn von Ratten wurde in einem Assay von M1 und M2 spezifischen Markern unmittelbar nach peripherer Nervenverletzung ein Anstieg beider Marker beobachtet. Zwischen Tag 7 und 14 waren jedoch überwiegend M1 Marker nachzuweisen (Xu et al., 2016). Auch bei einer direkten Rückenmarksverletzung von Mäusen war dies zu beobachten (Hu et al., 2012). Die zytotoxische Polarisierung zu M1 (Kigerl et al., 2009; Fleming et al., 2006) könnte über einen längeren Beobachtungszeitraum einen inflammatorischen Schaden am unbeteiligten N. tibialis hervorrufen, welcher per Neurographie oder als axonale Degeneration in Nervenschnitten nachweisbar ist. Der Nachweis einer Polarisierung von Mikroglia in Richtung M1 oder M2 könnte ausschlaggebend für Therapiekonzepte nach Nervenverletzung sein.

Auf molekularer Ebene lassen sich kleine und marginale Veränderungen besser nachweisen als in einer Immunfluoreszenzfärbung, deswegen sollte man die Möglichkeit in Betracht ziehen, mit Hilfe von PCR, Elisa oder Western Blot Zytokine oder spezifische Oberflächenproteine nachzuweisen. Zusätzlich wäre eine morphologische Analyse der Axone sinnvoll. So sind die unterschiedlich großen und in ihrer Funktion unterschiedlichen Axone unter Umständen verschieden stark betroffen. Es lassen sich bei SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen verschiedene Axonklassen unterscheiden, die unterschiedlich schnell degenerieren. (Hegedus et al., 2007; Pun et al., 2006). Nach Nervenverletzung könnte sich eine erhöhte Anfälligkeit einzelner Motoneurone von SOD1<sup>G93A</sup> Mäusen zeigen.

Weitere Erkenntnisse könnte es bringen, mit Hilfe von PLX5622 die Mikroglia und mit Clodronat die Makrophagen zu depletieren und danach Veränderungen von Motoneuronen und peripheren Nerven auszuwerten. Zwar wurde in Versuchen mit einer Nervenverletzung am N. opticus durch diese Depletion weder eine verlangsamte noch beschleunigte Regeneration entdeckt, doch die Mikroglia und rekrutierten Makrophagen scheinen eine entscheidende Rolle zu spielen (Hilla et al., 2017).

Wenn die Funktion von Mikroglia nach Nervenverletzung und in der neurodegenerativen Erkrankung ALS geklärt ist, könnten vorhandene Methoden und Medikamente eingesetzt werden, um die Regeneration oder den Krankheitsverlauf zu verbessern und neue Therapiekonzepte zu entwickeln.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adalbert, R., & Coleman, M. P. (2013). Review: Axon pathology in age-related neurodegenerative disorders. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(2), 90–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01308.x>
- Al-Chalabi, A., & Tripathi, V. (2008). Molecular Insights and Therapeutic Targets in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 7(1), 11–19. <https://doi.org/10.2174/187152708783885110>
- Aldskogius, H, Liu, L., & Svensson, M. (1999). Glial responses to synaptic damage and plasticity. *Journal of Neuroscience Research*, 58(1), 33–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10491570>
- Aldskogius, H. (2011). Mechanisms and consequences of microglial responses to peripheral axotomy. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 3, 857–868. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622237>
- Alexianu, M E, Kozovska, M., & Appel, S. H. (2001). Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology*, 57(7), 1282–1289. <https://doi.org/10.1212/wnl.57.7.1282>
- An, T., Shi, P., Duan, W., Zhang, S., Yuan, P., Li, Z., ... Guo, Y. (2014). Oxidative Stress and Autophagic Alteration in Brainstem of SOD1-G93A Mouse Model of ALS. *Molecular Neurobiology*, 49(3), 1435–1448. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8623-3>
- Andersen, P. M. (2006). Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 6(1), 37–46. <https://doi.org/10.1007/s11910-996-0008-9>
- Azzouz, M., Leclerc, N., Gurney, M., Warter, J. M., Poindron, P., & Borg, J. (1997). Progressive motor neuron impairment in an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, 20(1), 45–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8995582>
- Bácskai, T., Fu, Y., Sengul, G., Rusznák, Z., Paxinos, G., & Watson, C. (2013). Musculotopic organization of the motor neurons supplying forelimb and shoulder girdle muscles in the mouse. *Brain Structure and Function*, 218(1), 221–238. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0396-3>
- Bácskai, T., Rusznák, Z., Paxinos, G., & Watson, C. (2014). Musculotopic organization of the motor neurons supplying the mouse hindlimb muscles: A quantitative study using Fluoro-Gold retrograde tracing. *Brain Structure and Function*, 219(1), 303–321. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0501-7>
- Batt, J. A. E., & Bain, J. R. (2013). Tibial Nerve Transection - A Standardized Model for Denervation-induced Skeletal Muscle Atrophy in Mice. *Journal of Visualized Experiments*(81). <https://doi.org/10.3791/50657>

- Bauder, A. R., & Ferguson, T. A. (2012). Reproducible mouse sciatic nerve crush and subsequent assessment of regeneration by whole mount muscle analysis. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (60). <https://doi.org/10.3791/3606>
- Beers, D. R., Henkel, J. S., Zhao, W., Wang, J., & Appel, S. H. (2008). CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(40), 15558–15563. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807419105>
- Berg, A., Zelano, J., Pekna, M., Wilhelmsson, U., Pekny, M., & Cullheim, S. (2013). Axonal regeneration after sciatic nerve lesion is delayed but complete in GFAP- and vimentin-deficient mice. *PloS One*, 8(11), e79395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079395>
- Bischoff, C., & Mattler, W. S. (2016). Das EMG-Buch. EMG und periphere Neurologie in Frage und Antwort. *Aktuelle Neurologie*, 47(01), <https://doi.org/10.1055/b-003-125868>
- Biswas, S. K., Chittezhath, M., Shalova, I. N., & Lim, J.-Y. (2012). Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunologic Research*, 53(1), 11–24. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8291-9>
- Block, M. L., & Hong, J.-S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology*, 76(2), 77–98. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.004>
- Block, M. L., Zecca, L., & Hong, J.-S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1), 57–69. <https://doi.org/10.1038/nrn2038>
- Boillée, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kassiotis, G., ... Cleveland, D. W. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*, 312(5778), 1389–1392. <https://doi.org/10.1126/science.1123511>
- Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. S., Guarnieri, M., Xu, Z. S., Wong, P. C., ... Cleveland, D. W. (1994). Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(17), 8292–8296. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.17.8292>
- Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., ... Modlin, R. L. (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, 285(5428), 732–736. <https://doi.org/10.1126/science.285.5428.732>
- Brück, W. (1997). The Role of Macrophages in Wallerian Degeneration. *Brain Pathology*, 7(2), 741–752. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1997.tb01060.x>

- Caldwell, R. W., Rodriguez, P. C., Toque, H. A., Priya Narayanan, S., & Caldwell, R. B. (2018). Arginase: A multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiological Reviews*, 98(2), 641–665. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2016>
- Calvo, M., & Bennett, D. L. H. (2012). The mechanisms of microgliosis and pain following peripheral nerve injury. *Experimental Neurology*, 234(2), 271–282. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.08.018>
- Cassetta, L., Cassol, E., & Poli, G. (2011). Macrophage polarization in health and disease. *TheScientificWorldJournal*, 11, 2391–2402. <https://doi.org/10.1100/2011/213962>
- Cheng, Q., Yuan, Y., Sun, C., Gu, X., Cao, Z., & Ding, F. (2014). Neurotrophic and neuroprotective actions of *Achyranthes bidentata* polypeptides on cultured dorsal root ganglia of rats and on crushed common peroneal nerve of rabbits. *Neuroscience Letters*, 562, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.015>
- Chio, A., Traynor, B. J., Lombardo, F., Fimognari, M., Calvo, A., Ghiglione, P., ... Restagno, G. (2008). Prevalence of SOD1 mutations in the Italian ALS population. *Neurology*, 70(7), 533–537. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000299187.90432.3f>
- Chiò, A., Logroscino, G., Traynor, B. J., Collins, J., Simeone, J. C., Goldstein, L. A., & White, L. A. (2013). Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review of the Published Literature. *Neuroepidemiology*, 41(2), 118–130. <https://doi.org/10.1159/000351153>
- Chiu, A. Y., Zhai, P., Dal Canto, M. C., Peters, T. M., Kwon, Y. W., Prattis, S. M., & Gurney, M. E. (1995). Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 6(4), 349–362. <https://doi.org/10.1006/mcne.1995.1027>
- Chiu, I. M., Chen, A., Zheng, Y., Kosaras, B., Tsiftoglou, S. A., Vartanian, T. K., ... Carroll, M. C. (2008). T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(46), 17913–17918. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804610105>
- Chiu, Isaac M, Morimoto, E. T. A., Goodarzi, H., Liao, J. T., Keeffe, S. O., Phatnani, H. P., ... Maniatis, T. (2013). A neurodegeneration-specific gene expression signature and immune profile of acutely isolated microglia from an ALS mouse model. *Cell Reports*, 4(2), 385–401. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.018.A>
- Clark, A. K., & Malcangio, M. (2014). Fractalkine/CX3CR1 signaling during neuropathic pain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 121. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00121>
- Colton, C. A. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 4, 399–418. <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9164-4>

- Cozzolino, M., & Carri, M. T. (2012). Mitochondrial dysfunction in ALS. *Progress in Neurobiology*, 97(2), 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.06.003>
- Cullheim, S., & Thams, S. (2007). The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Research Reviews*, 55, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.03.012>
- Dalkin, W., Taetzsch, T., & Valdez, G. (2016). The Fibular Nerve Injury Method: A Reliable Assay to Identify and Test Factors That Repair Neuromuscular Junctions. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (114). <https://doi.org/10.3791/54186>
- Dall'Asta, M., Derlindati, E., Ardigo, D., Zavaroni, I., Brighenti, F., & Del Rio, D. (2012). Macrophage polarization: The answer to the diet/inflammation conundrum? *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22(5), 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2011.12.010>
- Dantes, M., & McComas, A. (1991). The extent and time course of motoneuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, 14(5), 416–421. <https://doi.org/10.1002/mus.880140506>
- De Luca, C., Savarese, L., Colangelo, A. M., Bianco, M. R., Cirillo, G., Alberghina, L., & Papa, M. (2016). Astrocytes and Microglia-Mediated Immune Response in Maladaptive Plasticity is Differently Modulated by NGF in the Ventral Horn of the Spinal Cord Following Peripheral Nerve Injury. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(1), 37–46. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0218-2>
- Deng, B., Lv, W., Duan, W., Liu, Y., Li, Z., Ma, Y., ... Li, C. (2018). Progressive Degeneration and Inhibition of Peripheral Nerve Regeneration in the SOD1-G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(6), 2358–2372. <https://doi.org/10.1159/000489627>
- Dibaj, P., Steffens, H., Zschüntzsch, J., Nadrigny, F., Schomburg, E. D., Kirchhoff, F., & Neusch, C. (2011). In vivo imaging reveals distinct inflammatory activity of CNS microglia versus PNS macrophages in a mouse model for ALS. *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017910>
- Dobrowolny, G., Bernardini, C., Martini, M., Baranzini, M., Barba, M., & Musarò, A. (2015). Muscle Expression of SOD1(G93A) Modulates microRNA and mRNA Transcription Pattern Associated with the Myelination Process in the Spinal Cord of Transgenic Mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 463. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00463>
- Eisen, A., & Weber, M. (2001). The motor cortex and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, 24(4), 564–573. <https://doi.org/10.1002/MUS.1042>
- El Kasmi, K. C., Qualls, J. E., Pesce, J. T., Smith, A. M., Thompson, R. W., Henao-Tamayo, M., ... Murray, P. J. (2008). Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nature Immunology*, 9(12), 1399–1406. <https://doi.org/10.1038/ni.1671>

- Fazal, R., Boeynaems, S., Swijssen, A., Decker, M. de, Fumagalli, L., Moisse, M., Vanneste, J., Guo, W., Boon, R., Vercruyse, T., Eggermont, K., Swinnen, B., Beckers, J., Pakravan, D., Vandoorne, T., Berghe, P. vanden, Verfaillie, C., Bosch, L. van den, & Damme, P. van. (2021). HDAC6 inhibition restores TDP-43 pathology and axonal transport defects in human motor neurons with TARDBP mutations. *The EMBO Journal*, 40(7). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2020106177>
- Fischer, L. R., Culver, D. G., Tennant, P., Davis, A. A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., ... Glass, J. D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: Evidence in mice and man. *Experimental Neurology*, 185(2), 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.10.004>
- Fischer, L. R., Li, Y., Asress, S. A., Jones, D. P., & Glass, J. D. (2012). Absence of SOD1 leads to oxidative stress in peripheral nerve and causes a progressive distal motor axonopathy. *Experimental Neurology*, 233(1), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.09.020>
- Fleming, J. C., Norenberg, M. D., Ramsay, D. A., Dekaban, G. A., Marcillo, A. E., Saenz, A. D., ... & Weaver, L. C. (2006). The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain*, 129(12), 3249-3269. <https://doi.org/10.1093/brain/awl296>
- Galli, S. J., Borregaard, N., & Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology*, 12(11), 1035–1044. <https://doi.org/10.1038/ni.2109>
- Gautier, E. L., Chow, A., Spanbroek, R., Marcelin, G., Greter, M., Jakubzick, C., ... & Randolph, G. J. (2012). Systemic analysis of PPAR $\gamma$  in mouse macrophage populations reveals marked diversity in expression with critical roles in resolution of inflammation and airway immunity. *The Journal of Immunology*, 189(5), 2614-2624. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3537497/>
- Ghatak, N. R., Campell, W. W., Lippmann, R. H., & Hadfield, M. G. (1986). Anterior Horn Changes of Motor Neuron Disease Associated with Demyelinating Radiculopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 45(4), 385–395. <https://doi.org/10.1097/00005072-198607000-00001>
- Gibbons, C., Pagnini, F., Friede, T., & Young, C. A. (2018). Treatment of fatigue in amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1(1). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011005.pub2>
- Glat, M. J., Benninger, F., Barhum, Y., Ben-Zur, T., Kogan, E., Steiner, I., ... Offen, D. (2016). Ectopic Muscle Expression of Neurotrophic Factors Improves Recovery After Nerve Injury. *Journal of Molecular Neuroscience*, 58(1), 39–45. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0648-9>
- Gordon, S. (2002). Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response. *Cell*, 111(7), 927–930. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01201-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01201-1)
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 3(1), 23–35. <https://doi.org/10.1038/nri978>

- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, 5(12), 953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1733>
- Graber, D. J., Hickey, W. F., & Harris, B. T. (2010). Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 7, 1-12. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-8>
- Grad, L. I., Rouleau, G. A., Ravits, J., & Cashman, N. R. (2017). Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024117>
- Graeber, M. B., Streit, W. J., & Kreutzberg, G. W. (1988). Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *Journal of Neuroscience Research*, 21(1), 18–24. <https://doi.org/10.1002/jnr.490210104>
- Gravel, M., Béland, L.-C., Soucy, G., Abdelhamid, E., Rahimian, R., Gravel, C., & Kriz, J. (2016). IL-10 Controls Early Microglial Phenotypes and Disease Onset in ALS Caused by Misfolded Superoxide Dismutase 1. *The Journal of Neuroscience*, 36(3), 1031–1048. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0854-15.2016>
- Gurney, M., Pu, H., Chiu, A., Dal Canto, M., Polchow, C., Alexander, D., ... (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264(5166), 1772–1775. <https://doi.org/10.1126/science.8209258>
- Hall, E. D., Oostveen, J. A., & Gurney, M. E. (1998). Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia*, 23(3), 249–256. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9633809>
- Hamzei Taj, S., Kho, W., Aswendt, M., Collmann, F. M., Green, C., Adamczak, J., ... Hoehn, M. (2016a). Dynamic Modulation of Microglia/Macrophage Polarization by miR-124 after Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 11(4), 733-748. <https://doi.org/10.1007/s11481-016-9700-y>
- Hamzei Taj, S., Kho, W., Riou, A., Wiedermann, D., & Hoehn, M. (2016b). MiRNA-124 induces neuroprotection and functional improvement after focal cerebral ischemia. *Biomaterials*, 91, 151-165. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.025>
- Hanisch, U.-K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40(2), 140–155. <https://doi.org/10.1002/glia.10161>
- Hanz, S., & Fainzilber, M. (2006). Retrograde signaling in injured nerve ? the axon reaction revisited. *Journal of Neurochemistry*, 99(1), 13–19. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04089.x>
- Hao, H. P., Doh-ura, K., & Nakanishi, H. (2007). Impairment of microglial responses to facial nerve axotomy in cathepsin S–deficient mice. *Journal of Neuroscience Research*, 85(10), 2196–2206. <https://doi.org/10.1002/jnr.21357>

- Hardiman, O., van den Berg, L. H., & Kiernan, M. C. (2011). Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 7(11), 639–649. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.153>
- Harrison, M., O'Brien, A., Adams, L., Cowin, G., Ruitenber, M. J., Sengul, G., & Watson, C. (2013). Vertebral landmarks for the identification of spinal cord segments in the mouse. *NeuroImage*, 68, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.11.048>
- Haverkamp, L. J., Appel, V., & Appel, S. H. (1995). Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain*, 118(3), 707–719. <https://doi.org/10.1093/brain/118.3.707>
- Hayashi, Y., Homma, K., & Ichijo, H. (2016). SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1 mutation-negative ALS. *Advances in Biological Regulation*, 60, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2015.10.006>
- He, B. P., Tay, S. S., & Leong, S. K. (1996). Macrophage and microglial cell response after common peroneal nerve cut and crush in C57BL/6J mice. *Neuroregeneration*, 5(1), 73–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8731385>
- Healy, S., McMahon, J., Owens, P., Dockery, P., & FitzGerald, U. (2018). Threshold-based segmentation of fluorescent and chromogenic images of microglia, astrocytes and oligodendrocytes in FIJI. *Journal of Neuroscience Methods*, 295, 87–103. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.12.002>
- Hegedus, J., Putman, C. T., & Gordon, T. (2007). Time course of preferential motor unit loss in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 28(2), 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.07.003>
- Henkel, J. S., Engelhardt, J. I., Siklós, L., Simpson, E. P., Kim, S. H., Pan, T., ... Appel, S. H. (2004). Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Annals of Neurology*, 55(2), 221–235. <https://doi.org/10.1002/ana.10805>
- Henkel, J. S., Beers, D. R., Siklós, L., & Appel, S. H. (2006). The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(3), 427–437. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2005.10.016>
- Henkel, J. S., Beers, D. R., Zhao, W., & Appel, S. H. (2009). Microglia in ALS: The good, the bad, and the resting. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 4, 389–398. <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9171-5>
- Hensley, K., Floyd, R. A., Gordon, B., Mou, S., Pye, Q. N., Stewart, C., ... Williamson, K. (2002). Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 82(2), 365–374. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00968.x>

- Hensley, K., Fedynyshyn, J., Ferrell, S., Floyd, R. A., Gordon, B., Grammas, P., ... Williamson, K. S. (2003). Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and TNF alpha-modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, *14*(1), 74–80. [https://doi.org/10.1016/s0969-9961\(03\)00087-1](https://doi.org/10.1016/s0969-9961(03)00087-1)
- Hilla, A. M., Diekmann, H., & Fischer, D. (2017). Microglia are irrelevant for neuronal degeneration and axon regeneration after acute injury. *Journal of Neuroscience*, *37*(25), 6113–6124. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0584-17.2017>
- Hiraga, A., Kuwabara, S., Doya, H., Kanai, K., Fujitani, M., Taniguchi, J., ... Yamashita, T. (2006). Rho-kinase inhibition enhances axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Journal of the Peripheral Nervous System*, *11*(3), 217–224. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2006.00091.x>
- Hobson, E. V., & McDermott, C. J. (2016). Supportive and symptomatic management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, *12*, 526–538. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.111>
- Honjoh, K., Nakajima, H., Hirai, T., Watanabe, S., & Matsumine, A. (2019). Relationship of Inflammatory Cytokines From M1-Type Microglia/Macrophages at the Injured Site and Lumbar Enlargement With Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury in the CCL21 Knockout (plt) Mouse. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*, 525. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00525>
- Hoogland, I. C. M., Houbolt, C., van Westerloo, D. J., van Gool, W. A., & van de Beek, D. (2015). Systemic inflammation and microglial activation: Systematic review of animal experiments. *Journal of Neuroinflammation*, *12*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12974-015-0332-6/TABLES/5>
- Hu, X., Li, P., Guo, Y., Wang, H., Leak, R. K., Chen, S., ... Chen, J. (2012). Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*, *43*(11), 3063–3070. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.659656>
- Hu, X., Liou, A. K. F., Leak, R. K., Xu, M., An, C., Suenaga, J., ... Chen, J. (2014). Neurobiology of microglial action in CNS injuries: Receptor-mediated signaling mechanisms and functional roles. *Progress in Neurobiology*, *119*, 60–84. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.06.002>
- Iijima, N., & Iwasaki, A. (2014). A local macrophage chemokine network sustains protective tissue-resident memory CD4 T cells. *Science*, *346*(6205), 93–98. <https://doi.org/10.1126/science.1257530>
- Ilieva, H. S., Nagano, I., Murakami, T., Shiote, M., Manabe, Y., & Abe, K. (2003). Age-related changes in peroxisomal membrane protein 70 and superoxide dismutase 1 in transgenic G93A mice. *Neurological Research*, *25*(4), 423–426. <https://doi.org/10.1179/016164103101201607>
- Ince, P. G., Shaw, P. J., Slade, J. Y., Jones, C., & Hudgson, P. (1996). Familial amyotrophic lateral sclerosis with a mutation in exon 4 of the Cu/Zn superoxide dismutase gene: pathological and immunocytochemical changes. *Acta Neuropathologica*, *92*(4), 395–403. <https://doi.org/10.1007/s004010050535>

- Inoue, K., & Tsuda, M. (2018). Microglia in neuropathic pain: Cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nature Reviews Neuroscience*, 19, 138–152. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.2>
- Jin, S.-X., Zhuang, Z.-Y., Woolf, C. J., & Ji, R.-R. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(10), 4017–4022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764087>
- Joshi, A. R., Muke, I., Bobylev, I., & Lehmann, H. C. (2019). ROCK inhibition improves axonal regeneration in a preclinical model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Comparative Neurology*, 527(14), 2334–2340. <https://doi.org/10.1002/cne.24679>
- Kang, J., & Rivest, S. (2007). MyD88-deficient bone marrow cells accelerate onset and reduce survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Cell Biology*, 179(6), 1219–1230. <https://doi.org/10.1083/jcb.200705046>
- Kashfi, K., Kannikal, J., & Nath, N. (2021). Macrophage Reprogramming and Cancer Therapeutics: Role of iNOS-Derived NO. *Cells*, 10(11), 3194. <https://doi.org/10.3390/CELLS10113194>
- Kigerl, K. A., Gensel, J. C., Ankeny, D. P., Alexander, J. K., Donnelly, D. J., & Popovich, P. G. (2009). Identification of Two Distinct Macrophage Subsets with Divergent Effects Causing either Neurotoxicity or Regeneration in the Injured Mouse Spinal Cord. *Journal of Neuroscience*, 29(43), 13435–13444. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3257-09.2009>
- Kilic, E., Weishaupt, J. H., Kilic, Ü., Rohde, G., Yulug, B., Peters, K., ... Bähr, M. (2004). The superoxide dismutase1 (SOD1) G93A mutation does not promote neuronal injury after focal brain ischemia and optic nerve transection in mice. *Neuroscience*, 128(2), 359–364. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.064>
- Kirby, J., Al Sultan, A., Waller, R., & Heath, P. (2016). The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*, 6, 49. <https://doi.org/10.2147/DNND.S84956>
- Köbber, C., Apps, R., Bechmann, I., Lanciego, J. L., Mey, J., & Thanos, S. (2000). Current concepts in neuroanatomical tracing. *Progress in Neurobiology*, 62(4), 327–351. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856608>
- Köbber, C., & Thanos, S. (2000). Topographic representation of the sciatic nerve motor neurons in the spinal cord of the adult rat correlates to region-specific activation patterns of microglia. *Journal of Neurocytology*, 29(4), 271–283. <https://doi.org/10.1023/A:1026523821261>
- Komori, T., Morikawa, Y., Inada, T., Hisaoka, T., & Senba, E. (2011). Site-specific subtypes of macrophages recruited after peripheral nerve injury. *NeuroReport*, 22(17), 911–917. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32834cd76a>

- Korte, N., Schenk, H. C., Grothe, C., Tipold, A., & Haastert-Talini, K. (2011). Evaluation of periodic electrodiagnostic measurements to monitor motor recovery after different peripheral nerve lesions in the rat. *Muscle and Nerve*. <https://doi.org/10.1002/mus.22023>
- Kotulska, K., LePecheur, M., Marcol, W., Lewin-Kowalik, J., Larysz-Brysz, M., Paly, E., ... London, J. (2006). Overexpression of copper/zinc-superoxide dismutase in transgenic mice markedly impairs regeneration and increases development of neuropathic pain after sciatic nerve injury. *Journal of Neuroscience Research*, *84*(5), 1091–1097. <https://doi.org/10.1002/jnr.21000>
- Krakauer, T. (2004). Molecular therapeutic targets in inflammation: Cyclooxygenase and NF- $\kappa$ B. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, *3*, 317–324. <https://doi.org/10.2174/1568010043343714>
- Kreutzberg, G. W. (1986). The Motoneuron and Its Microenvironment Responding to Axotomy. *Neural transplantation and regeneration* (pp. 271-276). Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-25264-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-662-25264-2_10)
- Lameijer, M. A., Tang, J., Nahrendorf, M., Beelen, R. H., & Mulder, W. J. (2013). Monocytes and macrophages as nanomedicinal targets for improved diagnosis and treatment of disease. *Expert review of molecular diagnostics*, *13*(6), 567-580. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23895127/>
- Lee, H., Baek, J., Min, H., Cho, I.-H., Yu, S.-W., & Lee, S. J. (2016). Toll-Like Receptor 3 Contributes to Wallerian Degeneration after Peripheral Nerve Injury. *Neuroimmunomodulation*, *23*(4), 209–216. <https://doi.org/10.1159/000449134>
- Lewis, K. E., Rasmussen, A. L., Bennett, W., King, A., West, A. K., Chung, R. S., & Chuah, M. I. (2014). Microglia and motor neurons during disease progression in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: Changes in arginase1 and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Neuroinflammation*, *11*(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-55>
- Li, D., Huang, Z. Z., Ling, Y. Z., Wei, J. Y., Cui, Y., Zhang, X. Z., Zhu, H. Q., & Xin, W. J. (2015). Up-regulation of CX3CL1 via Nuclear Factor- $\kappa$ B–dependent Histone Acetylation Is Involved in Paclitaxel-induced Peripheral Neuropathy. *Anesthesiology*, *122*(5), 1142–1151. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000560>
- Li, J., Pacheck, A., Sanchez, B., & Rutkove, S. B. (2016). Single and modeled multifrequency electrical impedance myography parameters and their relationship to force production in the ALS SOD1G93A mouse. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, *17*(5–6), 397–403. <https://doi.org/10.3109/21678421.2016.1165258>
- Liao, B., Zhao, W., Beers, D. R., Henkel, J. S., & Appel, S. H. (2012). Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Experimental Neurology*, *237*(1), 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.011>

- Lim, H., Lee, H., Noh, K., & Lee, S. J. (2017). IKK/NF- $\kappa$ B-dependent satellite glia activation induces spinal cord microglia activation and neuropathic pain after nerve injury. *Pain*, *158*(9), 1666–1677. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000959>
- Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Müller, W., ... Eming, S. A. (2010). Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *The Journal of Immunology*, *184*(7), 3964–3977. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903356>
- Lyon, M. S., Wosiski-Kuhn, M., Gillespie, R., Caress, J., & Milligan, C. (2019). Inflammation, Immunity, and amyotrophic lateral sclerosis: I. Etiology and pathology. *Muscle & Nerve*, *59*(1), 10–22. <https://doi.org/10.1002/mus.26289>
- Mallat, M., Houlgatte, R., Brachet, P., & Prochiantz, A. (1989). Lipopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF in vitro. *Developmental Biology*, *133*(1), 309–311. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(89\)90322-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(89)90322-9)
- Mancuso, R., Osta, R., & Navarro, X. (2014). Presymptomatic electrophysiological tests predict clinical onset and survival in SOD1G93A ALS mice. *Muscle and Nerve*, *50*(6), 943–949. <https://doi.org/10.1002/mus.24237>
- Mantovani, A., Sica, A., & Locati, M. (2005). Macrophage Polarization Comes of Age. *Immunity*, *23*(4), 344–346. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.10.001>
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of Pathology*, *229*(2), 176–185. <https://doi.org/10.1002/path.4133>
- Marinkovic, P., Reuter, M. S., Brill, M. S., Godinho, L., Kerschensteiner, M., & Misgeld, T. (2012). Axonal transport deficits and degeneration can evolve independently in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(11), 4296–4301. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200658109>
- Mariotti, Raffaella, & Bentivoglio, M. (2000). Activation and response to axotomy of microglia in the facial motor nuclei of G93A superoxide dismutase transgenic mice. *Neuroscience Letters*, *285*(2), 87–90. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01034-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01034-X)
- Mariotti, R., Cristino, L., Bressan, C., Boscolo, S., & Bentivoglio, M. (2002). Altered reaction of facial motoneurons to axonal damage in the presymptomatic phase of a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience*, *115*(2), 331–335. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00448-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00448-7)
- Martin, D., Thompson, M. A., & Nadler, J. V. (1993). The neuroprotective agent riluzole inhibits release of glutamate and aspartate from slices of hippocampal area CA1. *European Journal of Pharmacology*, *250*(3), 473–476. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90037-i](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90037-i)

- Martínez-Muriana, A., Mancuso, R., Francos-Quijorna, I., Olmos-Alonso, A., Osta, R., Perry, V. H., ... López-Vales, R. (2016). CSF1R blockade slows the progression of amyotrophic lateral sclerosis by reducing microgliosis and invasion of macrophages into peripheral nerves. *Scientific Reports*, *6*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep25663>
- Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., & Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience*, *13*(1), 453–461. <https://doi.org/10.2741/2692>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, *244*(22), 6049–6055.
- McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., ... Maki, R. A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *The EMBO Journal*, *15*(20), 5647–5658. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8896458>
- Miller, R. G., Mitchell, J. D., & Moore, D. H. (2012). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001447.pub3>
- Mohajeri, M. H., Figlewicz, D. A., & Bohn, M. C. (1998). Selective loss of  $\alpha$  motoneurons innervating the medial gastrocnemius muscle in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, *150*(2), 329–336. <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6758>
- Mohan, R., Tosolini, A. P., & Morris, R. (2014). Targeting the motor end plates in the mouse hindlimb gives access to a greater number of spinal cord motor neurons: An approach to maximize retrograde transport. *Neuroscience*, *274*, 318–330. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.045>
- Mokarram, N., Merchant, A., Mukhatyar, V., Patel, G., & Bellamkonda, R. V. (2012). Effect of modulating macrophage phenotype on peripheral nerve repair. *Biomaterials*, *33*(34), 8793–8801. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.050>
- Moran, L. B., & Graeber, M. B. (2004). The facial nerve axotomy model. *Brain Research Reviews*, *44*(2–3), 154–178. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2003.11.004>
- Münch, C., & Bertolotti, A. (2010). Exposure of Hydrophobic Surfaces Initiates Aggregation of Diverse ALS-Causing Superoxide Dismutase-1 Mutants. *Journal of Molecular Biology*, *399*(3), 512–525. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2010.04.019>
- Munder, M., Eichmann, K., Morán, J. M., Centeno, F., Soler, G., & Modolell, M. (1999). Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *Journal of Immunology*, *163*(7), 3771–3777. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490974>

- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews. Immunology*, *11*(11), 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Nazareth, L., St John, J., Murtaza, M., & Ekberg, J. (2021). Phagocytosis by Peripheral Glia: Importance for Nervous System Functions and Implications in Injury and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.660259>
- Neumann, H., Kotter, M. R., & Franklin, R. J. M. (2009). Debris clearance by microglia: An essential link between degeneration and regeneration. *Brain*, *132*(2), 288–295. <https://doi.org/10.1093/brain/awn109>
- Nourshargh, S., & Alon, R. (2014). Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity*, *41*(5), 694–707. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>
- Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Goforth, M. H., Morel, C. R., Subramanian, V., Mukundan, L., ... Chawla, A. (2007). Macrophage-specific PPAR $\gamma$  controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*, *447*(7148), 1116–1120. <https://doi.org/10.1038/nature05894>
- Ohgomori, T., Yamada, J., Takeuchi, H., Kadomatsu, K., & Jinno, S. (2016). Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD1G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*, *43*(10), 1340–1351. <https://doi.org/10.1111/ejn.13227>
- Okado-Matsumoto, A., & Fridovich, I. (2002). Amyotrophic lateral sclerosis: A proposed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(13), 9010–9014. <https://doi.org/10.1073/pnas.132260399>
- Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology*, *173*, 649–665. <https://doi.org/10.1111/bph.13139>
- Pan, L., Yoshii, Y., Otomo, A., Ogawa, H., Iwasaki, Y., Shang, H. F., & Hadano, S. (2012). Different human copper-zinc superoxide dismutase mutants, SOD1 G93A and SOD1 H46R, exert distinct harmful effects on gross phenotype in mice. *PLoS ONE*, *7*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033409>
- Peluffo, H., Solari-Saquieres, P., Negro-Demontel, M. L., Francos-Quijorna, I., Navarro, X., López-Vales, R., ... Lago, N. (2015). CD300f immunoreceptor contributes to peripheral nerve regeneration by the modulation of macrophage inflammatory phenotype. *Journal of Neuroinflammation*, *12*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0364-y>
- Peng, J., Gu, N., Zhou, L., B Eyo, U., Murugan, M., Gan, W.-B., & Wu, L.-J. (2016). Microglia and monocytes synergistically promote the transition from acute to chronic pain after nerve injury. *Nature Communications*, *7*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms12029>
- Perrin, S. (2014). Preclinical research: Make mouse studies work. *Nature*, *507*(7493), 423–425. <https://doi.org/10.1038/507423a>

- Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Mentink-Kane, M. M., Wilson, M. S., Kasmi, K. C. E., Smith, A. M., ... Wynn, T. A. (2009). Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathogens*, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000371>
- Polazzi, E., & Contestabile, A. (2002). Reciprocal interactions between microglia and neurons: From survival to neuropathology. *Reviews in the Neurosciences*, 13, 221–242. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2002.13.3.221>
- Pollari, E., Prior, R., Robberecht, W., Van Damme, P., & Van Den Bosch, L. (2018). In vivo Electrophysiological Measurement of Compound Muscle Action Potential from the Forelimbs in Mouse Models of Motor Neuron Degeneration. *Journal of Visualized Experiments*, 136. <https://doi.org/10.3791/57741>
- Pun, S., Santos, A. F., Saxena, S., Xu, L., & Caroni, P. (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nature Neuroscience*, 9(3), 408–419. <https://doi.org/10.1038/nn1653>
- Raivich, G., Jones, L. L., Kloss, C. U. A., Werner, A., Neumann, H., & Kreutzberg, G. W. (2018). Immune Surveillance in the Injured Nervous System: T-Lymphocytes Invade the Axotomized Mouse Facial Motor Nucleus and Aggregate around Sites of Neuronal Degeneration. *The Journal of Neuroscience*, 18(15), 5804–5816. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-15-05804.1998>
- Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009). Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 119–145. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528>
- Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I., & Munder, M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology*, 5, 532. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
- Ravits, J. M., & La Spada, A. R. (2009). ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: Deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology*, 73(10), 805–811. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181b6bbbd>
- Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. F., ... Snider, W. D. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature Genetics*, 13(1), 43–47. <https://doi.org/10.1038/ng0596-43>
- Ren, K., & Dubner, R. (2010). Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nature Medicine*, 16, 1267–1276. <https://doi.org/10.1038/nm.2234>
- Renton, A. E., Chiò, A., & Traynor, B. J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature Neuroscience*, 17(1), 17–23. <https://doi.org/10.1038/nm.3584>
- Richardson, P. M., Miao, T., Wu, D., Zhang, Y., Yeh, J., & Bo, X. (2009). Responses of the nerve cell body to axotomy. *Neurosurgery*, 65(suppl\_4), A74–A79. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000352378.26755.C3>

- Robinson, L. R. (2000). Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle & Nerve*, 23(6), 863–873. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10842261>
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., ... Brown, R. H. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59–62. <https://doi.org/10.1038/362059a0>
- Rotterman, T. M., Akhter, E. T., Lane, A. R., MacPherson, K. P., García, V. V, Tansey, M. G., & Alvarez, F. J. (2019). Spinal Motor Circuit Synaptic Plasticity after Peripheral Nerve Injury Depends on Microglia Activation and a CCR2 Mechanism. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 39(18), 3412–3433. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2945-17.2019>
- Rowland, L. P., & Shneider, N. A. (2001). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 344(22), 1688–1700. <https://doi.org/10.1056/NEJM200105313442207>
- Satriano, J. (2004). Arginine pathways and the inflammatory responses: Interregulation of nitric oxide and polyamines. Review article. *Amino Acids*, 26(4), 321–329. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0078-4>
- Scheib, J., & Höke, A. (2013). Advances in peripheral nerve regeneration. *Nature Reviews Neurology*, 9(12), 668–676. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.227>
- Schmued, L. C., & Fallon, J. H. (1986). Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Research*, 377(1), 147–154. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91199-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91199-6)
- Scholz, J., & Woolf, C. J. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1361–1368. <https://doi.org/10.1038/nn1992>
- Schram, S., Chuang, D., Schmidt, G., Piponov, H., Helder, C., Kerns, J., ... Loeb, J. A. (2019). Mutant SOD1 prevents normal functional recovery through enhanced glial activation and loss of motor neuron innervation after peripheral nerve injury. *Neurobiology of Disease*, 124, 469–478. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.12.020>
- Schram, S., Loeb, J. A., & Song, F. (2020). Disease propagation in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): an interplay between genetics and environment. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/S12974-020-01849-7>
- Serafin, A., Molin, J., Márquez, M., Blasco, E., Vidal, E., Foradada, L., ... Pumarola, M. (2010). Diabetic neuropathy: electrophysiological and morphological study of peripheral nerve degeneration and regeneration in transgenic mice that express IFNbeta in beta cells. *Muscle & Nerve*, 41(5), 630–641. <https://doi.org/10.1002/mus.21564>
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S.-A., Mardani, F., ... Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425–6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>

- Shefner, J. M., Brown, R. H., Cole, D., Chaturvedi, P., Schoenfeld, D., Pastuszak, K., ... Cudkowicz, M. E. (2001). Effect of neurophilin ligands on motor units in mice with SOD1 ALS mutations. *Neurology*, *57*(10), 1857–1861. <https://doi.org/10.1212/WNL.57.10.1857>
- Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(3), 787–795. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>
- Siddique, N., & Siddique, T. (2021). Amyotrophic Lateral Sclerosis Overview. GeneReviews®. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1450/>
- Streit, W. J. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, *40*(2), 133–139. <https://doi.org/10.1002/glia.10154>
- Svensson, M., Mattsson, P., & Aldskogius, H. (1994). A bromodeoxyuridine labelling study of proliferating cells in the brainstem following hypoglossal nerve transection. *Journal of Anatomy*, *185* ( Pt 3), 537–542. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7649789>
- Svensson, M., Liu, L., Mattsson, P., Morgan, B. P., & Aldskogius, H. (1995). Evidence for activation of the terminal pathway of complement and upregulation of sulfated glycoprotein (SGP)-2 in the hypoglossal nucleus following peripheral nerve injury. *Molecular and Chemical Neuropathology*, *24*(1), 53–68. <https://doi.org/10.1007/BF03160112>
- Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., ... Pittet, M. J. (2009). Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science*, *325*(5940), 612–616. <https://doi.org/10.1126/science.1175202>
- Taylor, P. R., & Gordon, S. (2003). Monocyte heterogeneity and innate immunity. *Immunity*, *19*(1), 2–4. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00178-x](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00178-x)
- Taylor, J. P., Brown, R. H., & Cleveland, D. W. (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*, *539*(7628), 197–206. <https://doi.org/10.1038/nature20413>
- Tortarolo, M., Lo Coco, D., Veglianesi, P., Vallarola, A., Giordana, M. T., Marcon, G., ... Bendotti, C. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis, a Multisystem Pathology: Insights into the Role of TNF  $\alpha$ . *Mediators of Inflammation*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2985051>
- Tsai, Y. L., Coady, T. H., Lu, L., Zheng, D., Alland, I., Tian, B., Shneider, N. A., & Manley, J. L. (2020). ALS/FTD-associated protein FUS induces mitochondrial dysfunction by preferentially sequestering respiratory chain complex mRNAs. *Genes and Development*, *34*(11–12), 785–805. <https://doi.org/10.1101/GAD.335836.119/-/DC1>
- Villalta, S. A., Nguyen, H. X., Deng, B., Gotoh, T., & Tidball, J. G. (2009). Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, *18*(3), 482–496. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn376>

- Vogel, P. (2018). Kursbuch–Klinische Neurophysiologie. EMG–ENG–Evozierte Potentiale. *Klinische Neurophysiologie*. <https://doi.org/10.1055/b-005-149021>
- Wanner, R., Gey, M., Abaei, A., Warnecke, D., de Roy, L., Dürselen, L., ... Knöll, B. (2017). Functional and Molecular Characterization of a Novel Traumatic Peripheral Nerve–Muscle Injury Model. *NeuroMolecular Medicine*, *19*(2–3), 357–374. <https://doi.org/10.1007/s12017-017-8450-1>
- Watanabe, M., Dykes-Hoberg, M., Cizewski Culotta, V., Price, D. L., Wong, P. C., & Rothstein, J. D. (2001). Histological Evidence of Protein Aggregation in Mutant SOD1 Transgenic Mice and in Amyotrophic Lateral Sclerosis Neural Tissues. *Neurobiology of Disease*, *8*(6), 933–941. <https://doi.org/10.1006/NBDI.2001.0443>
- Wessendorf, M. W. (1991). Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake. *Brain Research*, *553*(1), 135–148. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90241-m](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90241-m)
- Wojtera, M., Sobów, T., Kłoszewska, I., Liberski, P. P., Brown, D. R., & Sikorska, B. (2012). Expression of immunohistochemical markers on microglia in Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer’s disease: morphometric study and review of the literature. *Folia Neuropathologica*, *50*(1), 74–84.
- Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *Journal of Pathology*, *214*(2), 199–210. <https://doi.org/10.1002/path.2277>
- Wynn, Thomas A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, *496*(7446), 445–455. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Xu, F., Huang, J., He, Z., Chen, J., Tang, X., Song, Z., ... Huang, C. (2016). Microglial polarization dynamics in dorsal spinal cord in the early stages following chronic sciatic nerve damage. *Neuroscience Letters*, *617*, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.01.038>
- Yin, Y., Phạm, T. L., Shin, J., Shin, N., Kang, D.-W., Lee, S. Y., ... Kim, D.-W. (2020). Arginase 2 Deficiency Promotes Neuroinflammation and Pain Behaviors Following Nerve Injury in Mice. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(2), 305. <https://doi.org/10.3390/jcm9020305>
- You, M., Rong, R., Zeng, Z., Xia, X., & Ji, D. (2021). Transneuronal Degeneration in the Brain During Glaucoma. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*, 157. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2021.643685>
- You, Y., Joseph, C., Wang, C., Gupta, V., Liu, S., Yiannikas, C., Chua, B. E., Chitranshi, N., Shen, T., Dheer, Y., Invernizzi, A., Borotkanics, R., Barnett, M., Graham, S. L., & Klistorner, A. (2019). Demyelination precedes axonal loss in the transneuronal spread of human neurodegenerative disease. *Brain*, *142*(2), 426–442. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWY338>
- Yoshihara, T., Ishigaki, S., Yamamoto, M., Liang, Y., Niwa, J. I., Takeuchi, H., ... Sobue, G. (2002). Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, *80*(1), 158–167. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00683.x>

- Zarei, S., Carr, K., Reiley, L., Diaz, K., Guerra, O., Altamirano, P., ... China, A. (2015). A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surgical Neurology International*, 6(1), 171. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.169561>
- Zhang, B., Tu, P., Abtahian, F., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (1997). Neurofilaments and Orthograde Transport Are Reduced in Ventral Root Axons of Transgenic Mice that Express Human SOD1 with a G93A Mutation. *The Journal of Cell Biology*, 139(5), 1307–1315. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.5.1307>
- Zhang, F., Vadakkan, K. I., Kim, S. S., Wu, L. J., Shang, Y., & Zhuo, M. (2008). Selective activation of microglia in spinal cord but not higher cortical regions following nerve injury in adult mouse. *Molecular Pain*, 4, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-15>
- Zhang, J., Liu, Y., Liu, X., Li, S., Cheng, C., Chen, S., & Le, W. (2018). Dynamic changes of CX3CL1/CX3CR1 axis during microglial activation and motor neuron loss in the spinal cord of ALS mouse model. *Translational Neurodegeneration*, 7(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40035-018-0138-4>
- Zhang, K., Wang, Q., Liang, Y., Yan, Y., Wang, H., Cao, X., Shan, B., Zhang, Y., Li, A., & Fang, Y. (2021). Quantitative Proteomic Analysis of Mouse Sciatic Nerve Reveals Post-injury Upregulation of ADP-Dependent Glucokinase Promoting Macrophage Phagocytosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2021.777621>
- Zhou, X., He, X. J., & Ren, Y. (2014). Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural Regeneration Research*, 9, 1787–1795. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.143423>

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Degenerationsprozess der ALS .....	15
Abbildung 2 Motoneurondegeneration im Rückenmark.....	17
Abbildung 3 Aufbau der elektroneurographischen Messungen .....	32
Abbildung 4 Versuchsaufbau Auswertung der Interessensregionen.....	39
Abbildung 5 Repräsentativer Schnitt des N. tibialis .....	40
Abbildung 6 Versuchsskizze.....	41
Abbildung 7 Immunhistochemische Färbung gegen Iba1 von Rückenmarksschnitten (L4/L5) unverletzter Kontrolltiere.....	43
Abbildung 8 Quantifizierung von Mikroglia im Rückenmark (L4/L5) von Wildtyptieren, präsymptomatischen und symptomatischen SOD1 <sup>G93A</sup> Mäusen.....	44
Abbildung 9 Akkumulation von Mikroglia im Rückenmark von Wildtypmäusen sieben Tage nach Verletzung des N. peroneus.....	45
Abbildung 10 Akkumulation von Mikroglia im Rückenmark von präsymptomatischen SOD1 <sup>G93A</sup> Mäusen sieben Tage nach Verletzung des N. peroneus.....	46
Abbildung 11 Akkumulation von Mikroglia im Rückenmark von symptomatischen SOD1 <sup>G93A</sup> Mäusen sieben Tage nach Verletzung des N. peroneus.....	47
Abbildung 12 Verhältnis der Mikrogliazahl ipsi- zu kontralateral sieben Tage nach Nervenverletzung.....	48
Abbildung 13 M1/M2 Färbung von Rückenmarksschnitten und Positivkontrollen.....	49
Abbildung 14 Rückenmarksquerschnitte (L4/L5) mit Färbung von Iba1+ Mikroglia und Tracersignal in Motoneuronen des N. tibialis.....	51
Abbildung 15 Versuchsskizze Rückenmark nach Nervenverletzung und Tracerinjektion	52
Abbildung 16 Quantifizierung der Mikroglia innerhalb der ROI des N. tibialis von Wildtypmäusen nach Nervenverletzung des N. peroneus .....	53
Abbildung 17 Quantifizierung der Mikroglia innerhalb der ROI des N. tibialis präsymptomatischer SOD1 <sup>G93A</sup> Mäuse nach Nervenverletzung des N. peroneus .....	54
Abbildung 18 Quantifizierung der Mikroglia innerhalb der ROI des N. tibialis symptomatischer SOD1 <sup>G93A</sup> Mäuse nach Nervenverletzung des N. peroneus .....	55
Abbildung 19 Repräsentative Neurographen .....	56
Abbildung 20 Neurographie des N. tibialis vor Intervention .....	57
Abbildung 21 Neurographie des N. tibialis sieben Tage nach Läsion des N. peroneus .....	58
Abbildung 22 Quantitative Auswertung der Axone des N. tibialis.....	59

## 7.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1 Chemikalien</b> .....	26
<b>Tabelle 2 Kits</b> .....	26
<b>Tabelle 3 Primer</b> .....	26
<b>Tabelle 4 Primärantikörper</b> .....	26
<b>Tabelle 5 Sekundärantikörper</b> .....	26
<b>Tabelle 6 Geräte</b> .....	27
<b>Tabelle 7 Lysepuffer</b> .....	29
<b>Tabelle 8 PCR Reaktionsmischung für eine SOD1<sup>G93A</sup> Maus</b> .....	29
<b>Tabelle 9 TAE Puffer</b> .....	30
<b>Tabelle 10 Antikörper Mikrogliafärbung</b> .....	36
<b>Tabelle 11 Antikörper M1/M2 Färbung</b> .....	37
<b>Tabelle 12 Mittelwerte und mittlere Standardfehler Iba1+ Pixel nach Tracerinjektion, ROI = Interessensregion</b> .....	50