



Verstärkte Langzeitpotenzierung und Umprogrammierung kortikaler Verbindungen nach Schädigungen der Sehrinde

Thomas Mittmann und Ulf T. Eysel

Zusammenfassung

Treten Verletzungen der Sehrinde im Erwachsenenalter auf, reagiert das Zentralnervensystem mit einer funktionserhaltenden Reorganisation, bei der Nervenzellen in der Sehrinde durch Verstärkung synaptischer Kontakte neu verdrahtet werden und so neue oder zusätzliche Funktionen übernehmen können. Das geschieht zum Beispiel in der direkten Umgebung lokaler Schädigungen der primären Sehrinde. Diese Reorganisationsvorgänge haben wir *in vivo* im Sehsystem der Katze und *in vitro* im Kortex von Ratten untersucht. Veränderungen der funktionellen Repräsentation des Sehraumes *in vivo* (größere rezeptive Felder, veränderte Retinotopie) weisen auf Veränderungen der synaptischen Kopplung von Neuronen hin. Die *in vitro* Untersuchungen der synaptischen Plastizität ebenso wie immunhistochemische und molekularbiologische Arbeiten weisen auf Mechanismen, die auf eine transiente Regression in Richtung frühkindlicher Programme mit erhöhter Bereitschaft zur synaptischen Remodellierung deuten: Verschiebungen der Balance von Erregung und Hemmung zugunsten einer höheren Erregbarkeit, verstärkte synaptische Plastizität (Langzeitpotenzierung, LTP) und Veränderungen der beteiligten Glutamat-Rezeptoren. Von den modellhaft im Experiment gewonnenen Daten besteht ein Bezug zur klinisch-neurologischen Medizin und der möglichen Verbesserung einer trainingsabhängigen Rehabilitation nach Schädigungen des Zentralnervensystems.

Abstract

Enhanced long-term potentiation and reprogramming of cortical connections after lesions of the visual cortex

The visual cortex responds to injury in the adult with reorganization and functional restoration. Visual cortical neurons are newly connected by increasing weights of synaptic contacts and take over new or additional functions. This takes place in the vicinity of local damage in the primary visual cortex. We have investigated this cortical reorganization in the cat visual cortex *in vivo* and in the rat visual cortex *in vitro*. Changes of the functional representation of visual space *in vivo* (larger receptive fields, changed retinotopy) indicate changes in the synaptic connectivity of neurons. The related *in vitro* studies of synaptic plasticity as well as immunohistochemistry and molecular biology indicate underlying mechanisms that are reminiscent of a transient regression towards early postnatal patterns with an increased potential for synaptic remodelling: the balance between excitation and inhibition is shifted towards increased excitability, synaptic plasticity (long-term potentiation, LTP) is increased, and the involved glutamate receptors are modified. The experimental data can be related to neurological medicine and the possibility to improve training-induced rehabilitation following damage of the central nervous system.

Key words: visual cortex; lesions; receptive fields; long-term potentiation (LTP); calcium imaging

Einleitung

Nach lokalen Defekten der Sehrinde treten bei Patienten umschriebene Gesichtsfeldausfälle (Skotome) auf, deren Größe das Ausmaß des neuronalen Zelltods und der funktionellen Beeinträchtigung kortikaler Neurone widerspiegelt. Abbildung 1A zeigt eine experimentelle Thermoläsion im visuellen Kortex, deren funktionelle Auswirkungen im intakten Gehirn mit der Methode der optischen Registrierung intrinsischer Signale (optical imaging) gemessen werden. Man sieht nicht nur die Abschwächung der Signalstärke im geschädigten Gebiet (Abbildung 1 B), sondern in der Umgebung der Läsion (Penumbra) auch den Verlust spezifischer neuronaler Leistungen wie der Analyse der Orientierung visueller Reize (Abbildung 1C). Das Verfahren des optical imaging ist nicht-invasiv, eine Videokamera und aufwendige Nachbearbeitung im Rechner machen die Unterschiede der Lichtabsorption sichtbar, die in aktiven Gebieten größer ist als in inaktiven. Das Ausmaß der nach einer Läsion beobachteten Ausfälle kann sich mit der Zeit und insbesondere unter spezifischem Training verkleinern (Zihl und von Cramon 1979, 1985; Kasten et al. 1998; Eysel und Schweigart 1999). Eine mögliche Grundlage für die Funktionsverbesserung ist die Reaktivierung von „stummen“ Zellen in der nur partiell geschädigten Penumbra der Läsion durch verstärkte Aktivierung ihrer synaptischen Verbindungen. Eine andere Möglichkeit besteht in der Vergrößerung der rezeptiven Felder von Zellen am Läsionsrand, die dazu führt, dass Teile des verlorenen Gesichtsfeldes von diesen Zellen zusätzlich „übernommen“ und damit für die Wahrnehmung wieder zugänglich werden. Generell können adaptive Prozesse in sensorischen Kortexbereichen erhebliche Reorganisationen nach Läsionen bewirken (Übersichten bei Kaas 1991; Eysel 1992; Gilbert 1998). Nach Läsionen in der somatosensorischen Hirnrinde des erwachsenen Affen wurde bereits früher eine Verkleinerung des sensorischen Ausfalls durch Vergrößerung rezeptiver Felder in der Handregion gefunden (Jenkins und Merzenich 1987). Wie der somatosensorische, so hat auch der visuelle Kortex ein erhebliches Potential zu Plastizität und Reorganisation. Vielfach wurde bereits eine kortikale Plastizität nach Läsionen der Netzhaut beobachtet (Kaas et al. 1990; Heinen und Skavenski 1991; Gilbert und Wiesel 1992; Chino et al. 1995; Eysel et al. 1999; Arckens et al. 2000). In diesen Fällen wird die von der Zerstörung der Netzhaut betroffene Region des visuellen Kortex durch verstärkte Anknüpfung horizontal-lateraler Verbindungen aus normalen

Nachbarregionen reaktiviert (Das und Gilbert 1995). Längerfristig wird dieser Prozess von anatomischen Veränderungen begleitet, bei denen die Endigungen der horizontalen Nervenfasern lokalisiert im betroffenen Gebiet aussprossen und so vermehrte Kontakte bilden können (Darian-Smith und Gilbert 1994). Bei der Reorganisation nach Hirnrindenläsionen steht diese Möglichkeit wegen der direkten Schädigung der Zellen nicht mehr zur Verfügung und es müssen andere Reparaturmechanismen genutzt werden. Primär wird eine allgemein erhöhte Erregbarkeit in der Umgebung kortikaler Läsionen beobachtet (Eysel und Schmidt-Kastner 1991), die parallel zu speziellen Veränderungen kortikaler Plastizität auftritt. Um das genauer zu untersuchen, haben wir auf Veränderungen der Größe rezeptiver Felder in den ersten Tagen und Monaten nach Schädigungen im visuellen Kortex geachtet (Eysel und Schweigart 1999; Schweigart und Eysel 2002). Außerdem haben wir studiert, wie die rezeptive Feldgröße durch wiederholte, natürliche Reize verändert werden kann (Eysel et al. 1998; Eyding et al. 2002). Bei diesen *in vivo* Experimenten zeigte sich, dass häufig wiederholte Reizung verbunden mit hohen Entladungsraten rezeptive Felder verändern kann. Da wiederholte hochfrequente Benutzung von Synapsen zur synaptischen Verstärkung durch Langzeitpotenzierung (LTP) führt, kamen wir zu der Hypothese, dass die von uns gemessenen Veränderungen rezeptiver Feldgrößen auf LTP-artigen Mechanismen beruhen. Die LTP hat eine wichtige Bedeutung als zelluläres Modell für Lernen und Gedächtnis, und kann in Hirnschnittpräparaten nach hochfrequenter Stimulation von afferenten Eingängen als verstärkte synaptische Übertragung für einen Zeitraum von >1 Stunde gemessen werden. Sie wurde im Säugtier-ZNS bereits vor längerer Zeit u.a. im Hippocampus (Lomo 2003) sowie im visuellen Kortex von Ratten nachgewiesen (Artola und Singer 1987; Kirkwood et al. 1995). Unter Bedingungen einer verstärkten synaptischen Plastizität, wie sie z.B. im jungen visuellen Kortex während der Phase der kritischer Perioden im Entwicklungsalter auftritt, ist die LTP am stärksten exprimiert (Katz 1999). Um unsere Hypothese zur läsionsinduzierten Reorganisation in der Sehrinde zu prüfen, haben wir den visuellen Kortex der Ratte mit Läsionen in Gehirnschnitten *in vitro* auf zelluläre Mechanismen synaptischer Plastizität untersucht (Mittmann und Eysel 2001; Barmashenko et al. 2001). Die Ergebnisse ergaben charakteristische Veränderungen der Plastizität nach Läsionen, die geeignet sind, die Hypothese von LTP-artigen

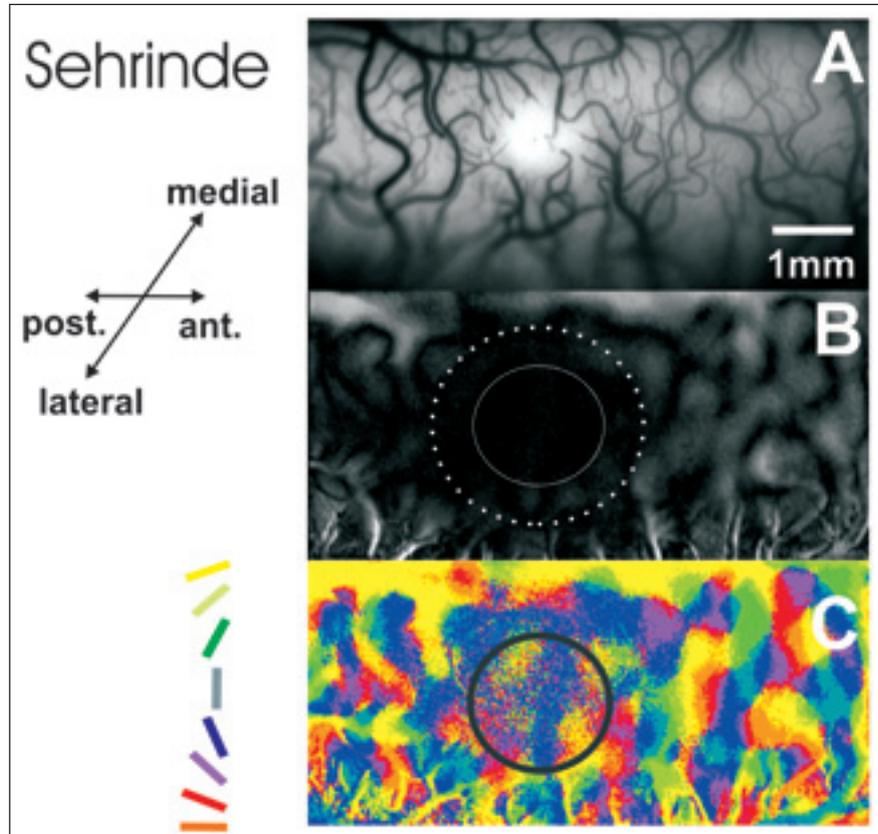


Abb. 1: Schädigung der Sehrinde einer Katze mit direkten und indirekten Funktionsausfällen.

(A) Auf der freigelegten Hirnoberfläche ist das Läsionsgebiet deutlich durch die fehlende Durchblutung erkennbar. Die mit einem Lichtkoagulator berührungsfrei erzeugte Schädigung hat einen Durchmesser von rund einem Millimeter. (B) Die Ableitung intrinsischer optischer Signale zeigt, dass um den Kern der vollständigen Läsion (durchgezogener Kreis) ein Bereich mit unterdrückter Funktion zu sehen ist. Hier ist die Signalstärke deutlich verringert (gepunkteter Kreis). In dieser Darstellung sind höhere Aktivitäten als hellere Grauwerte dargestellt. (C) Die Aktivierung der Sehrinde durch Reize verschiedener Orientierung ist hier farbmarkiert dargestellt. Während im Kern der Läsion alle funktionelle Spezifität aufgehoben ist, zeigt die Karte in der Übergangsregion eine aufgelöste Struktur, die sich weiter entfernt vom Läsionsrand normalisiert.

Mechanismen bei der Umprogrammierung der Sehrinde nach Schädigungen zu stützen.

Umprogrammierung der Sehrinde nach lokalen Schädigungen *in vivo*

Wir haben das Verhalten von einzelnen Nervenzellen in der Randregion von Sehrindenläsionen bei erwachsenen Katzen mit Mikroelektroden untersucht (Eysel und Schweigart 1999; Schweigart und Eysel 2002). Zuerst wurde in einer kleinen Sehrindenregion eine experimentelle Läsion durch excitotoxischen Zelltod ausgelöst (lokale Übererregung der Nervenzellen durch Ibotensäure). Der folgende, erregungsbedingte „Selbstmord“ von Nervenzellen tritt auch natürlicherweise in den Randregionen von Ausfällen beim Schlaganfall auf. Die Vermessung

der Repräsentation des Gesichtsfeldes im Kortex mit Bestimmung der rezeptiven Felder durch Mikroelektrodenableitungen von einzelnen Nervenzellen zeigt einen Gesichtsfeldausfall. Die rezeptiven Felder in der Randregion sind in ihrer Größe primär normal und repräsentieren in korrekter Weise die Umgebung der Läsion, so dass ein blinder Bereich im Gesichtsfeld an der Stelle der Läsion entsteht (Abbildung 2A). Ohne Einfluss visueller Reize bleibt dieser Zustand in den ersten Tagen nach der Schädigung unverändert (mittlere Größe der rezeptiven Felder 101% im Vergleich zu den RF-Größen vor der Schädigung in derselben Sehrindenregion).

Wir konnten allerdings zeigen, dass wiederholte Stimulation von rezeptiven Feldern mit Reizen, die das Feld selbst und seine di-

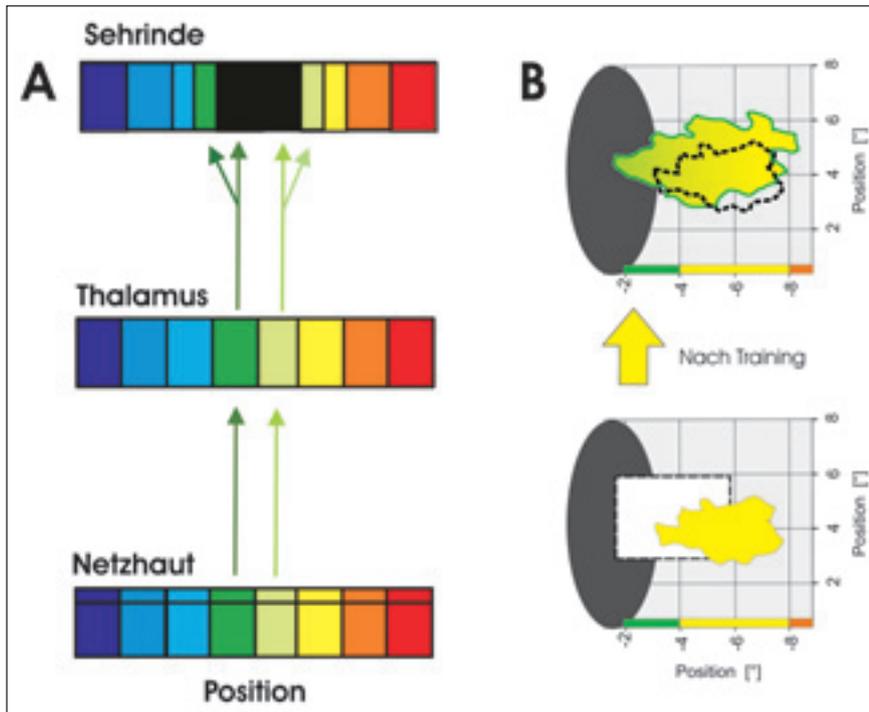


Abb. 2: Schematische Darstellung des topographischen Ausfalls und seiner Kompensation durch vergrößerte receptive Felder am Läsionsrand.

(A) Die Ortsinformation ist hier farbkodiert. Benachbarte Regionen aus der Netzhaut sind auch in Thalamus und Sehrinde benachbart. Das bietet die Grundlage zu einer Kompensation einer Sehrindenschädigung (schwarzer Bereich). Am Eingang zur Sehrinde liegt die gesamte Information vor. Der blinde Bereich im Gesichtsfeld (Skotom, siehe Text) ist durch die fehlenden Zielzellen in der Sehrinde bedingt. Wenn die Zellen am Läsionsrand die Information für die Nachbarzellen mit übernehmen, dann kann der Ausfall kompensiert werden. Alle topographischen Bereiche der Netzhaut stehen wieder für die Wahrnehmung zur Verfügung. Dabei kommt es zu einer Vergrößerung der receptive Felder, die jetzt sowohl ihre alten als auch die neuen Funktionen erfüllen.

(B) Ein Trainingsprogramm mit häufig wiederholten Reizen, das gezielt den erregbaren Bereich eines receptive Feldes einer Zelle gemeinsam mit seinem unerregbaren Umfeld stimuliert (unten), führt zu einer Vergrößerung des Funktionsbereichs dieser Zelle (oben). Dabei wird durch die zusätzliche Funktion der Zelle der blinde Bereich verkleinert. Der Farbübergang von Gelb nach Hellgrün im vergrößerten receptive Feld symbolisiert die gleichzeitige Repräsentation der alten Funktion (Gelb) und der neu übernommenen (Grün) durch ein und dieselbe Zelle.

rekt angrenzende Umgebung zugleich erregen, zu einer Vergrößerung von receptive Feldern führen kann (Eysel et al. 1998; Eydin et al. 2002). Das passt zu einem generell beobachteten kortikalen Phänomen, das in der Vergrößerung stark erregter Areale besteht. Das wird ebenso nach elektrischer intrakortikaler Mikrostimulation des visuellen Kortex (Godde et al. 2002) wie nach verstärkter Aktivierung des Kortex durch ganz bestimmte visuelle Reize beobachtet (z.B. wenn Reize ganz bestimmter Orientierung isoliert und lange Zeit wiederholt dargeboten werden (Dragoi et al. 2001).

Wenn wir Zellen am Läsionsrand 2 Tage nach der Schädigung einem Training mit wiederholten Reizen aussetzen, das darauf abzielt, die Randregion der receptive Felder zu er-

weitern (Schweigart und Eysel 2002), tritt tatsächlich innerhalb einer Stunde eine Feldvergrößerung auf, die im Mittel rund einem Grad Sehwinkel entspricht (Abbildung 2B).

Die zeitlich eng korrelierte Reizung von receptive Feldern und ihrer unmittelbaren Umgebung, wie wir sie experimentell bei narkotisierten Tieren durch wiederholte, zeitgleiche Erregung realisiert haben, erfolgt bei den wachen Tieren nach der Läsion in ihrer gewohnten Umgebung: Augenbewegungen über Kontrastgrenzen hinweg führen zu häufiger, hochfrequentere und korrelierter Erregung receptive Felder und ihrer unmittelbaren Umgebung. Wenn wir die receptive Feldkarte in der Sehrinde dann nach zwei Monaten an der Läsionsgrenze überprüfen (Abbildung 3A, B), haben einzelne Zellen erheblich ausgedehntere

rezeptive Feld-Vergrößerungen als im akuten Experiment in den ersten Tagen nach der Läsion (Abbildung 3C). Die Felder von Läsionsrandzellen (innerhalb eines Millimeters) sind entsprechend ihrer Nutzung beim freien Umherblicken in einer visuell strukturierten Umgebung in alle Richtungen vergrößert (im Mittel 182% größer als in den Kontrollen vor der Schädigung). Einzelne Zellen zeigten RF-Vergrößerungen um bis zu 7.8° Sehwinkel - damit wurde der ehemals blinde Bereich im Gesichtsfeld komplett ausgefüllt und war für die Wahrnehmung wieder verfügbar (Abbildung 3C). Die Vergrößerung der receptive Felder bedeutet, dass Nervenzellen Bereiche des Gesichtsfeldes übernommen haben, die vorher von Zellen wahrgenommen wurden, die durch den Gehirnschaden verloren gegangen sind. Diese Übernahme von Funktionen der verlorenen Nachbarzellen verringert den durch die Schädigung des Gehirns entstandenen blinden Bereich. Tatsächlich vernachlässigen die einzelnen Zellen nicht ihre alten Aufgaben, sie lernen die neuen Fähigkeiten zusätzlich (Vergrößerung der receptive Felder anstelle einer örtlichen Verlagerung).

Mit den von uns im Experiment beobachteten Feldvergrößerungen verschiebt sich die Grenze eines kortikalen Skotoms um 3-4°. Dies entspricht in der Größenordnung der mittleren Gesichtsfeldverbesserung um 4.9°, die bei Patienten beobachtet wurde, die nach zentralen Schädigungen der Sehbahn ein Computer-gestütztes Gesichtsfeldtraining ausführten (Kasten et al. 1998).

Zellen, die weiter vom Läsionsrand entfernt lagen, zeigten in unseren Studien keine Veränderungen der receptive Felder. Das wirft die Frage auf, was in der Läsionsrandregion anders ist. In früheren Arbeiten hatten wir eine erhöhte Erregbarkeit von Zellen in der Läsionsrandregion beobachtet (Eysel und Schmidt-Kastner 1991). Diese Region liegt bei dem excitotoxischen Läsionsmodell näher am Läsionsrand als bei unserem zweiten Läsionsmodell, einer Thermoläsion, die durch Laserstrahlen oder durch auf die Kortexoberfläche fokussiertes Xenon-Licht erzeugt wird. Durch die damit einhergehende Schädigung der lokalen Durchblutung in der Umgebung (Lindsberg et al. 1991) tritt hier in der Penumbra nahe der Läsion eine Unterdrückung der Funktion auf, der erst weiter entfernt die Zone der Übererregbarkeit folgt. Ausgehend von der Beobachtung der funktionellen Veränderungen der receptive Felder im Randbereich der Läsionen und der Hypothese, dass LTP-artige, synaptische Plastizität zugrunde liegt, haben wir Hirschnitte des visuellen Kortex von Ratten mit lokalisierten Thermoläsionen *ex vivo* - *in vitro* untersucht.

Läsionsinduzierte, verstärkte Langzeitpotenzierung im visuellen Kortex *in vitro*

Unsere Hypothese ist, dass diese Umprogrammierung von Zellfunktionen am besten durch die sogenannte Langzeitpotenzierung (LTP) erklärbar ist. Dabei führt eine wiederholte und hochfrequente Nutzung von Zellkontakten zu deren dauerhafter Verstärkung. Für diese Experimente verwendeten wir akute, kortikale Hirnschnitte von Ratten. Das Hirnschnittpräparat wird „in vitro“ in einer künstlichen, zerebrospinalen Flüssigkeit inkubiert, und ist so für 8-12 Stunden vital. Unter optischer Kontrolle eines Infrarotmikroskopes kann mit scharfer Mikroelektrode von einem einzelnen Neuron im Hirnschnitt das Membranpotential intrazellulär abgeleitet werden (Abbildung 4A, B).

Die LTP wird durch eine Theta-Burst-Stimulation (TBS) ausgelöst, bei der innerhalb einer Minute drei Salven von je 20 hochfrequent wiederholten erregenden Antwortpotentialen (EPSP) an der Synapse ausgelöst werden. Normalerweise verändern die Zellen in der erwachsenen Sehrinde nach einer solchen Reizung die Stärke ihrer Verbindungen nur geringfügig, die Größe der gemessenen postsynaptischen Potentiale (LTP) zeigt sich bis zu einer Stunde nach Gabe des TBS nur schwach vergrößert. Die aufregende Entdeckung unserer Arbeiten der letzten Jahre war, dass die hierfür notwendige synaptische Plastizität nach einer Schädigung des Gehirns nicht etwa schwächer, sondern deutlich verstärkt ist. Ein Gehirn, das „eingefahrene“ Bahnen benutzt, erhält plötzlich Fähigkeiten des jugendlichen Gehirns zurück: es ist wieder wesentlich besser in der Lage, neu- bzw. umzulernen und es bildet neue Verschaltungen aus. So konnten wir in Hirnschnitten von Ratten mit kleinen Laserläsionen zeigen, dass bei Zellen in einem definierten Abstand vom Läsionsrand und bis zu einer Woche nach Induktion der Verletzung eine hochsignifikant verstärkte Langzeitpotenzierung auftritt (Abbildung 5A, B). Während im gesunden Gehirn weniger als die Hälfte der Zellen eine schwache LTP zeigt (Amplitudensteigerung auf $134.5 \pm 9.9\%$ der Ausgangsamplitude), fanden wir am Läsionsrand bereits in der ersten Woche nach der Verletzung bei zwei Dritteln aller Zellen eine deutlich stärkere Langzeitpotenzierung (Amplitudensteigerung auf $191.3 \pm 20.8\%$). Durch verstärkte Aktivierung wird die Verbindung zwischen Nervenzellen - die Synapse - effektiver, sie koppelt zwei Zellen stärker aneinander. So kann Information, die vorher durch schwache Synapsen nicht

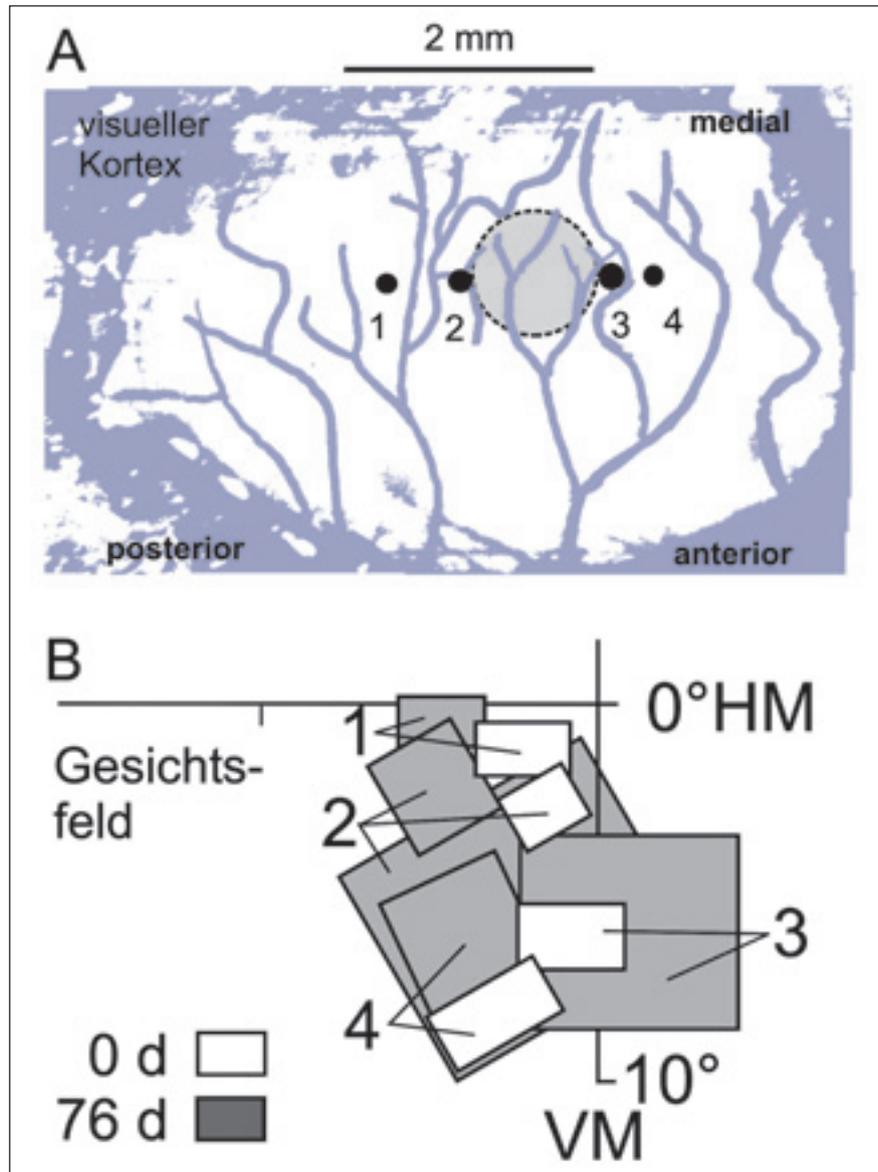


Abb. 3: Registrierung der Größe rezeptiver Felder an identischen Orten vor und 2 Monate nach einer lokalisierten Schädigung der Sehrinde.
(A) Die Oberfläche der Sehrinde ist den Ableitorten (1-4) und der Ausdehnung der Läsion (grauer Bereich im gepunkteten Kreis) schematisch überlagert. Die Zahlen markieren die Ableitstellen vor und nach der Läsion.
(B) Die größten rezeptiven Felder vor der Läsion sind weiß dargestellt, die größten rezeptiven Felder nach 76 Tagen sind grau markiert. Während die Felder bei 1 in der Größe vergleichbar sind, finden sich bei den läsionsnahen Orten 2-4 stark vergrößerte rezeptive Felder nach über 2 Monaten.

weitergeleitet werden konnte, eine Zelle erreichen – und so könnten durch diese Reorganisation im visuellen Kortex Teile des Gesichtsfeldes, die primär verloren waren, durch verstärktes Ankoppeln schwacher Eingänge wieder wahrgenommen werden.

Wie kann nun der adulte Kortex eine solche Erhöhung in der synaptischen Plastizität verwirklichen?

Wir haben bereits in einer früheren elektrophysiologischen Arbeit gezeigt, dass am Läsionsrand die Balance zwischen der exzitatorischen, glutamatergen sowie der inhibitorischen GABAergen synaptischen Übertragung gestört ist (Mittmann et al. 1994). So haben wir eine Schwächung in der Effizienz der GABAergen synaptischen Transmission im läsionsbehandelten Neokortex beobachtet. Zugleich wurde eine erhöhte NMDA-Rezeptor abhängige synaptische Transmission gemessen. Wie pharmakologische Studien gezeigt haben, erleichtern diese funktionellen

Veränderungen die Balance zwischen der exzitatorischen, glutamatergen sowie der inhibitorischen GABAergen synaptischen Übertragung gestört ist (Mittmann et al. 1994). So haben wir eine Schwächung in der Effizienz der GABAergen synaptischen Transmission im läsionsbehandelten Neokortex beobachtet. Zugleich wurde eine erhöhte NMDA-Rezeptor abhängige synaptische Transmission gemessen. Wie pharmakologische Studien gezeigt haben, erleichtern diese funktionellen

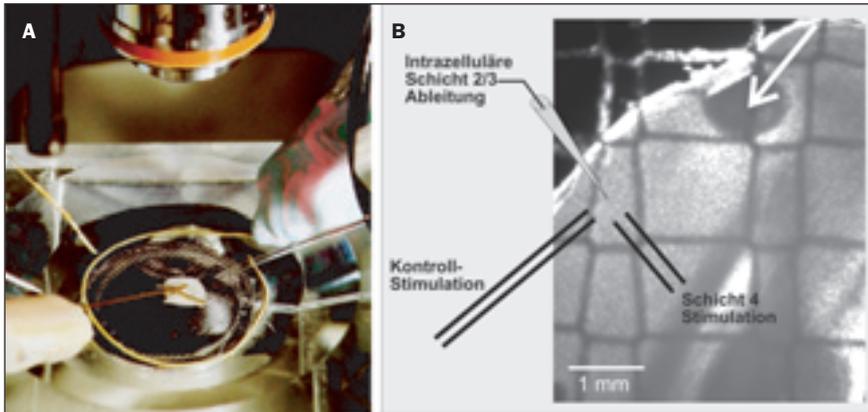


Abb. 4: Die *in vitro* Ableitsituation (A) Fotografie der Messkammer, in dessen Zentrum ein vitaler, koronaler Hirnschnitt des visuellen Kortex lagert. Dieser weist eine Dicke von 350µm auf und wird mit künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit umspült. Unter mikroskopischer Kontrolle werden die Reiz- und Ableitelektroden eingebracht. (B) Ein kortikaler Hirnschnitt am post-Läsionstag 3 (siehe Pfeil) mit der schematischen Darstellung der Ableitelektrode für die intrazellulären Ableitungen in der Kortexschicht II/III, sowie die Position der Reizelektroden in der Kortexschicht IV (gepaarter Eingang für die LTP Induktion) sowie lateral von der Ableitstelle in Schicht II (Kontrolleingang).

Veränderungen im kortikalen Netzwerk die Ausbildung von LTP (Artola und Singer 1987; Hümeke et al. 2002).

Als eine weitere Ursache für die verstärkte synaptische Plastizität des Gehirns post-Läsion konnten wir die intraneuronale Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ in den Zellen am Läsionsrand identifizieren (Barmashenko et al 2001). Durch Messungen der Fluoreszenz eines ionensensitiven Farbstoffes (Fura-2)

konnten wir zeigen, dass sowohl die neuronale Ruhe-Kalzium-Konzentration als auch der Stimulus-induzierte Kalziumeinstrom am Läsionsrand moderat erhöht ist. Zusätzliche pharmakologische Experimente gaben Hinweise auf eine verstärkte Beteiligung von ionotropen NMDA- und AMPA Rezeptoren an der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Dies lässt den Schluss zu, dass der verstärkte Kalziumeinstrom ein zusätzlicher zellulärer Mechanis-

mus für die verstärkte LTP am Läsionsrand ist (Abbildung 6).

Weitere Experimente ergaben Hinweise auf eine Veränderung in der Zusammensetzung der Untereinheiten von ionotropen Glutamat-rezeptorkanälen am Läsionsrand.

(1) So konnte mittels kompetitiver Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine veränderte Expression der m-RNA für die NMDA-Rezeptor Untereinheiten NR2A und NR2B nachgewiesen werden (Rumpel et al. 2000). Dies könnte bedeuten, dass die NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors am Läsionsrand verstärkt exprimiert wird. Interessanterweise findet sich eine verstärkte Expressierung der NR2B-Untereinheit auch im gesunden, früh-postnatalen Kortex (Monyer et al. 1994), die mit erhöhter synaptischer Plastizität einhergeht (Kirkwood et al. 1995).

(2) Auch die ionotropen AMPA-Rezeptoren zeigten veränderte funktionelle Eigenschaften am Läsionsrand, die in den oben beschriebenen Kalzium-Imaging Experimenten durch eine unter Kontrollbedingungen nicht vorhandene Kalziumpermeabilität sichtbar wurden (Barmashenko et al. 2001). Diese Kalziumpermeabilität lässt sich durch eine Veränderung in der Zusammensetzung der Untereinheiten des AMPA-Rezeptors erklären: eine reduzierte Expression in der GluR2 Untereinheit, welche unter physiologischen Bedingungen nur in früh-postnatalen Gewebe beobachtet wird, ermöglicht einen Kalziumeinstrom durch die AMPA-Rezeptoren am Läsionsrand (Pellegrini-Giampietro et al. 1997; Kumar et al. 2002).

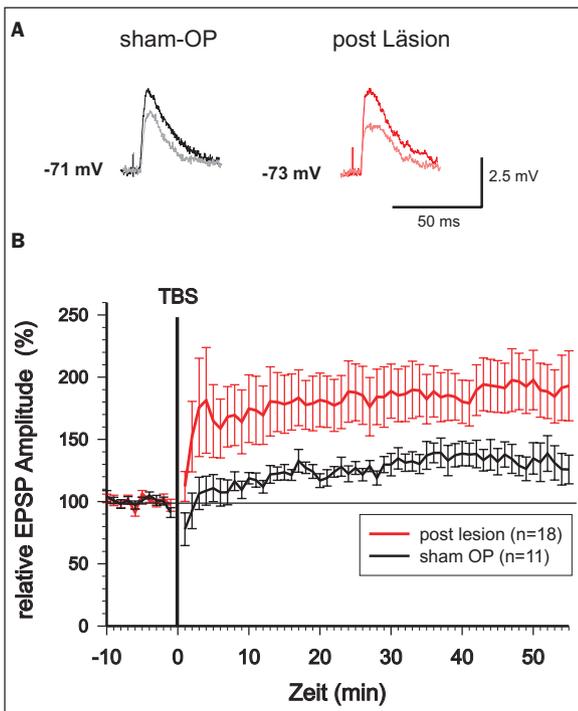


Abb. 5: Verstärkte LTP nach Läsionen (A) Original Spannungsspur (EPSPs) einer intrazellulären Ableitung von einem Neuron aus Kontrollgewebe (grau/schwarz) sowie nach einer Läsion (hellrot/dunkelrot). Die graue und die hellrote Spur wurden 5 Minuten vor Gabe der Theta-Burst Stimulation (TBS) aufgezeichnet, während die schwarze und dunkelrote Spur eine Aufnahme 55 Minuten nach Gabe des TBS zeigt. Beachten Sie nach TBS das größere Signal im läsionsbehandelten Kortex. (B) Mittelwertdiagramm des Zeitverlaufes der relativen Änderungen in der EPSP Amplitude in Kontrollen (schwarz) sowie im visuellen Kortex am Läsionsrand (rot). Beachten Sie die stärkere Expression der LTP im verletzten Gewebe.

Zusammenfassung und Ausblick

Die veränderte synaptische Plastizität unmittelbar nach Eintreten der Verletzung bedeutet ein erhöhtes Potential des Gehirns, den Schaden zu kompensieren. Unter molekularen und zellphysiologischen Aspekten scheint dieses Phänomen der frühkindlichen Plastizität des Gehirns ähnlich. Die „alten“ Zellen lernen wieder wie in ihrer Jugendzeit in den ersten Wochen nach der Geburt. Wenn geeignete Reize auf eine Zelle einwirken, kann sie neue Verknüpfungen bilden oder schwache Verbindungen so verstärken, dass sie neue Funktionen übernehmen kann. Das stellt eine interessante biologische Anpassung der Hirnrinde dar, durch Selbstreparatur und Umprogrammierung überleben zu können.

Das Besondere an unserem Forschungsansatz ist die Verbindung vom System (der Betrachtung des gesamten, funktionierenden Gehirns) mit den zellulären Grundlagen, der Elektrophysiologie und bildgebenden Verfahren sowie der Anatomie und molekularen

Ansätzen. Dabei liegt das Schwergewicht bei uns in experimentell-systemischen Fragestellungen, die direkte Verbindungen zur menschlichen Physiologie und Pathologie eröffnen. Die hier beschriebene Rückkehr zur frühkindlichen Plastizität nach einer Gehirnschädigung ist allein schon für die Grundlagenforschung ein aufregendes Ergebnis. Für die Therapie hirngeschädigter Patienten könnten unsere Beobachtungen aber über die bereits gesicherten Erkenntnisse der letzten Jahre hinaus neue Impulse geben. Dass das Gehirn auch im hohen Alter plastisch und lernfähig ist, hat die Forschung der letzten 20 Jahre gezeigt. Dass es nach Schädigungen vorübergehend sogar „jünger“ und plastischer werden kann, ist dagegen neu. Möglicherweise eröffnet die erleichterte Plastizität in der Umgebung von Schädigungen neue Wege zu einer besseren Rehabilitation. Allerdings ist der Zustand erleichteter Plastizität nicht dauerhaft, sondern zeitlich begrenzt. Wie die Untersuchungen an Hirnschnitten erkennen lassen, steht nach der Schädigung nur ein bestimmtes Zeitfenster zur Verfügung, in dem die Lernbereitschaft der Zellen maximal ist. Danach ist zwar nicht alles verloren, aber es bedarf viel größerer Anstrengungen, um einen vergleichbaren Lernerfolg bei den Zellen und damit eine Funktionsverbesserung zu erreichen. Die bereits jetzt erfolgreichen Trainingsprogramme könnten noch effektiver eingesetzt werden, wenn der Zeitverlauf einer vorübergehend verstärkten Plastizität mit einbezogen würde. In diese Richtung geht unsere Forschung. Wir wollen eine Brücke zur klinischen Medizin schlagen und helfen, die Behandlungsmethoden für Menschen nach Hirnschädigungen zu verbessern.

Erste Untersuchungen am Menschen deuten darauf hin, dass sich die im Tierversuch gewonnene Daten auf klinisch-medizinische Anwendungen übertragen lassen. Möglicherweise lassen sich nach Verletzungen und Zelltod Hirnfunktionen tatsächlich durch ein frühzeitiges Training leichter wieder zurückgewinnen.

Literatur

- Arckens, L., Schweigart, G., Qu, Y., Wouters, G., Pow, D.V., Vandesande, F., Eysel, U.T. und Orban, G.A. (2000): Cooperative changes in GABA, glutamate and activity levels: the missing link in cortical plasticity. *Eur. J. Neurosci.* 12: 4222-4232.
- Artola, A. und Singer, W. (1987): Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature* 330: 649-652.
- Kaas, J.H. (1991): Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals. *Annu Rev Neurosci* 14: 137-167.

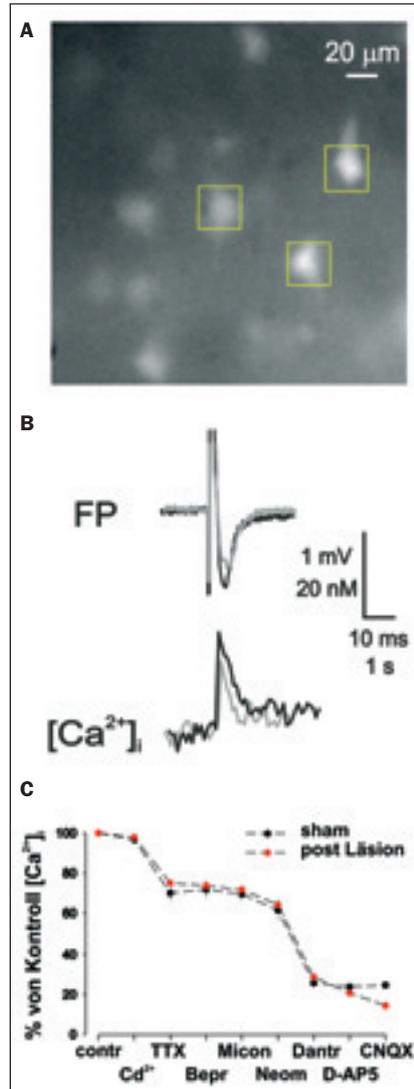


Abb. 6: Kalzium Imaging am Läsionsrand (A) Fotografie eines Schnittes aus dem visuellen Kortex, dessen Neurone mit dem Kalzium-sensitiven Farbstoff Fura2-AM beladen wurden. Das Gewebe wurde unter einem Epifluoreszenzmikroskop mit Licht geeigneter Wellenlänge beleuchtet, wodurch der Farbstoff in den Neuronen eine bestimmte Fluoreszenzintensität zeigte, die nach Kalibrierung des Systems einer definierten intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ entspricht. Die gelben Quadrate zeigen fluoreszierende Neurone, die mit einer geeigneten Computersoftware ausgewertet wurden. (B) Nach synaptischer Stimulation konnten in der kortikalen Schicht II/III extrazelluläre Feldpotentiale (FPs) aufgezeichnet werden (obere Spuren), während simultan der Stimulus korrelierte neuronale Kalziumeinstrom in der Nähe der Ableitelektrode aufgezeichnet wurde (untere Spuren). Im Vergleich zu den Kontrollaufnahmen (graue Spuren) konnte nach TBS Gabe bis zu 55 Minuten eine LTP mit vergrößerten FPs (obere schwarze Spur) gemessen werden, was mit einem gleichzeitig verstärkten Kalziumeinstrom korrelierte (untere schwarze Spur). (C) Weitere Imaging Experimente zeigten eine läsions-induzierte signifikant erhöhte Sensitivität (rote Sechsecke) der intraneuronalen Ruhekonzentration für spezifische Antagonisten des NMDA-Rezeptors (D-AP5) sowie des AMPA-Rezeptors (CNQX).

Mittmann, T. und Eysel, U.T. (2001): Increased synaptic plasticity in the surround of visual cortex lesions in rats. *Neuroreport* 12: 3341-3347.

Schweigart, G. und Eysel, U.T. (2002): Activity-dependent receptive field changes in the surround of adult cat visual cortex lesions. *Eur J Neurosci* 15: 1585-1596.

Eine ausführliche Literaturliste kann bei den Autoren angefordert werden.

Kurzbiographien

Thomas Mittmann: 1983-1990 Biologiestudium an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz und der Philipps-Universität Marburg, 1991-1994 Promotion zum Dr.rer.nat. bei Prof. Uwe Heinemann und Dr. Heiko Luhmann im Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universität zu Köln. 1995-1997 Forschungsaufenthalt bei Prof. Wayne Crill und Prof. Bertil Hille im

Department of Physiology and Biophysics an der University of Washington, Seattle, U.S.A. durch ein Feodor-Lynen Stipendium der Alexander von Humboldt Stiftung. 1997-1999 Aufbau eines elektrophysiologischen *in vitro* Labors als wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Ulf Eysel in der Abteilung für Neurophysiologie der Ruhr-Universität Bochum. Seit 2000 wissenschaftlicher Assistent bei Prof. Ulf Eysel. 1999-2001 Teilprojektleiter im SFB 509 „Neuronale Mechanismen des Sehens“, Ruhr-Universität Bochum. Seit 2003 Fakultätsmitglied der „International Graduate School of Neuroscience“ (IGSN) an der Ruhr-Universität Bochum. Forschungsgebiete: Neurophysiologie und Pathophysiologie des Neokortex, Zelluläre Mechanismen von synaptischer Plastizität.

Ulf T. Eysel: 1965-1971 Medizinstudium an der Freien Universität Berlin, Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes, Promotion zum Dr.med. und Approbation als Arzt; 1968/69 Forschungs- und Studienaufenthalt an der University of Miami, Florida, USA. 4 Jahre Forschungsstipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft am



Physiologischen Institut der Freien Universität Berlin, 2 Jahre Habilitationsstipendiat der DFG. 1975 Habilitation für das Fach „Physiologie“. 1976 Berufung an das Institut für Physiologie am Universitätsklinikum Essen und Ernennung zum wissenschaftlichen Rat und Professor für Physiologie, 1981/82 Gastprofessur an der University of Chicago, USA, Department of Physiological and Pharmacological Sciences. 1987 Ernennung zum Universitätsprofessor (C4) und geschäftsführenden Leiter der Abteilung für Neurophysiologie in der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum. 1991-1995 Mitglied des Senatsausschusses der DFG und des Bewilligungsausschusses für die Sonderforschungsbereiche. 1994 Gottfried Wilhelm Leibniz-Preis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Seit 1996 Sprecher SFB 509 „Neuronale Mechanismen des Sehens“, Ruhr-Universität Bochum. Seit 1996 Mitglied der DFG Senatskommission für tierexperimentelle Forschung. 1997-1998 Präsident der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft und Dekan der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum. Section Editor NeuroReport (Visual System), Experimental Brain Research (Sensory Physiology), Receiving Editor Neuroscience Research, Japan (System/Behavioral Neuroscience), Reviewing Editor: Neuroscience (IBRO). Forschungsgebiete: Neuro- und Sinnesphysiologie. Sehsystem - Struktur und Funktion, Neuronale Plastizität, Pathophysiologie, Neuropharmakologie.

Glossar

AMPA-Rezeptor: Ein liganden-gesteuerter Ionenkanal, Hauptligand ist die exzitatorische Aminosäure L-Glutamat. Das Rezeptormolekül bildet ein Pentamer aus bis zu vier verschiedenen Untereinheiten (GluR1-4). Die funktionellen Eigenschaften des AMPA-Rezeptors hängen wesentlich davon ab, aus welchen Untereinheiten das Rezeptormolekül zusammengesetzt ist. Der Rezeptorkanal hat eine hohe Permeabilität für Na⁺- und K⁺-Ionen währenddessen die Ca²⁺ Durchlässigkeit von den Eigenschaften der GluR2 Untereinheit limitiert wird.

Excitotoxischer Zelltod: Der Neurotransmitter L-Glutamat und strukturanaloge Substanzen können bei erhöhter Konzentration durch Übererregung und vermutlich die daraufhin folgende Störung des intrazellulären Kalziumgleichgewichts zu selektivem Zelltod von Neuronen führen.

Gesichtsfeld: Der bei unbewegtem Auge überschaubarer Bereich; monokular, mit ei-

nem Auge, beim Menschen ca. 140°, binokular, beidäugig, ca. 220°.

Kritische Periode: Sensible Phase in der Entwicklung des Zentralnervensystems, in der es seine Verschaltungen differenziert und besonders stark auf äußere Reize reagiert. In dieser Phase ist die neuronale Plastizität verstärkt.

Langzeitpotenzierung (LTP): An isolierten Hirnschnitten ist es möglich, aktivitätsabhängige Langzeitveränderungen in der synaptischen Übertragung zu untersuchen. Starke und gleichzeitige Aktivierung von Afferenzen und deren nachgeschalteten Zellen führt zu einer lang anhaltenden Verbesserung der synaptischen Übertragung, einer Langzeitpotenzierung (LTP).

NMDA-Rezeptor: Er wird ebenfalls hauptsächlich durch L-Glutamat aktiviert. Besonderheiten: (1) er ist sowohl für Kalium und Natrium, als auch für Kalziumionen permeabel; (2) Der Kalzium-Einstrom durch NMDA-Kanäle aktiviert kalzium-abhängige Second-Messenger Kaskaden; (3) Der Kanal öffnet sich nur in Gegenwart von Glycin; (4) er zeigt neben einem liganden- auch ein spannungsgesteuertes Verhalten, welches sich durch eine Blockierung der Kanalöffnung beim Ruhemembranpotential (ca. -70mV) zeigt. Diese Blockierung wird durch Anlagerung von Magnesiumionen im Extrazellulärraum vermittelt. Bei Depolarisation der Zellmembran wird das Magnesium durch die elektrostatische Abstoßung aus dem Kanal getrieben, wodurch Natrium und Kaliumionen den Ionenkanal passieren können.

Optische Messung intrinsischer Signale: Ein Verfahren, bei dem die Lichtabsorption der Gehirnoberfläche (im orange-roten Bereich) mit hochempfindlichen Kameras gemessen wird. Der wichtigste Faktor ist dabei die Oxygenierung des roten Blutfarbstoffs, des Hämoglobins. Deoxygeniertes Hämoglobin absorbiert in diesem Wellenlängenbereich stärker, wodurch in den Rohdaten dieser Messungen aktive Gebiete, in denen mehr Sauerstoff verbraucht wird, dunkler erscheinen. Achtung: in Abb. 1B ist bereits eine Weiterverrechnung erfolgt, nach der helle Grauwerte höhere Aktivität darstellen. Durch Verrechnung von Messungen mit verschiedenen Reizbedingungen (z.B. verschiedenen Reizorientierungen) können farbkodierte Karten hergestellt werden, bei denen die Farben jene Regionen anzeigen, in denen der entsprechende Reiz am stärksten beantwortet wird.

Penumbra: Randgebiet einer Läsion (in der Regel durch Durchblutungsstörungen (Infarkt) bedingt), die einen Übergang von vollständigem Zelluntergang im Zentrum der Schädigung zu weiter entfernt gelegener, vollständig normalen Gewebe darstellt. In der Penumbra ist die Zellfunktion reduziert und kann sowohl in verzögerten Zelltod als auch in einer Restitution der Zellfunktion übergehen.

Retinotopie: Topographische Abbildung der Netzhaut in den nachgeschalteten Stationen der Sehbahn, hier im visuellen Kortex.

Rezeptives Feld: Örtlicher Bereich (z.B. der Netzhaut) innerhalb dessen ein Reiz zur Erregung einer Zelle (z.B. im visuellen Kortex) führt.

Skotom: Gesichtsfeldausfall. Blinder Bereich im Gesichtsfeld, der auf einer Schädigung der Sehbahn beruht, in unserem Fall bedingt durch Verlust der Zellen in der Sehirnrinde, die normalerweise den betreffenden Gesichtsfeldbereich repräsentieren.

Thermoläsion: Hitzeläsion. Unselektive, nicht invasive Zerstörung von Gewebe durch Koagulation. In unserem Fall durch fokussiertes Licht einer starken Xenon-Lampe oder durch Laserstrahlen - beide Methoden werden klinisch zur Koagulation in der Netzhaut eingesetzt, werden von uns aber auch zur Erzeugung standardisierter, kleiner Hirnläsionen verwendet. Die Hitzeläsion ist von einer Penumbra umgeben.

Theta-Burst Stimulation (TBS): Eine spezifische Reizung der afferenten Fasern zur Auslösung von LTP. Sie ist gekennzeichnet durch 3 Stimmulationsereignisse innerhalb einer Minute. Diese Stimmulationsereignisse bestehen aus je 20 hochfrequenten Einzelreizen mit einer maximalen Frequenz von 100Hz.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Ulf Eysel, Dr. Thomas Mittmann
Abteilung für Neurophysiologie
Medizinische Fakultät
Ruhr-Universität Bochum
D-44780 Bochum
Tel.: ++49 (0) 234 32 23849
Fax: ++49 (0) 234 32 14192
e-mail: eyssel@rub.de