

Aus der Abteilung Neuroanatomie  
(Prof. Dr. med. J. Staiger)  
im Zentrum Anatomie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Morphologische Veränderungen im Nucleus nervi facialis und im Motorkortex  
adulter Ratten nach Durchtrennung des Nervus facialis**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Catharina Bonnemann

aus Berlin

Göttingen 2011

**Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel**

**I. Berichterstatter: PD Dr. med. M. Rickmann**

**II. Berichterstatter/in:**

**III. Berichterstatter/in:**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

# INHALTSVERZEICHNIS

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Thema und klinische Relevanz.....	1
1.2	Zum Grundverständnis der verwendeten Begriffe.....	3
1.2.1	Grundlagen der Sensomotorik.....	3
1.2.2	Aufbau eines peripheren Nerven.....	5
1.2.3	Pathophysiologie der peripheren Nervenläsion.....	5
1.2.4	Neuronale Plastizität.....	6
1.2.4.1	Entwicklungsplastizität.....	6
1.2.4.2	Kortikale (Repräsentations-)Plastizität.....	7
1.2.4.3	Klinische Relevanz der Neuroplastizität.....	9
1.2.5	Synaptische Plastizität.....	11
1.2.5.1	Synapsenadhäsion.....	12
1.2.5.2	Das postsynaptische Adhäsionsmolekül Neuroligin 1.....	13
1.2.6	Rolle von Glia bei neuromodulatorischen Vorgängen.....	14
1.2.7	Interaktion von Astrozyten und Neuronen.....	16
1.2.8	S100-Proteine.....	18
1.3	Anmerkungen und Voraussetzungen zum Versuchsmodell.....	20
1.3.1	Der Nervus facialis als Versuchsmodell.....	20
1.3.2	Der Verlauf des Nervus facialis beim Menschen und bei der Ratte und seine anatomische Darstellbarkeit.....	23
1.3.3	Innervation der mimischen Muskulatur bei der Ratte.....	23
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>27</b>
2.1	Zielproteine.....	27
2.2	Experimentalbedingungen.....	28
2.2.1	Versuchstiere und Narkose.....	28
2.2.2	Operativer Zugang und Läsion.....	28
2.3	Präparation des Gewebes.....	30
2.4	Immunhistochemische Darstellung der untersuchten Proteine.....	30
2.4.1	Immunohistochemie.....	30
2.5	Quantifizierung der Kortexareale mit erhöhter Immunoreaktivität.....	31
2.6	Scanvorgang.....	32
2.7	Elektronenmikroskopie.....	33

2.7.1	Konventionelle Elektronenmikroskopie.....	33
2.7.2	S100 "pre-embedding" elektronenmikroskopische Immunzytochemie.....	33
2.8	Western Blot.....	34
2.8.1	SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen nach Laemmli (1970).....	34
2.8.2	Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	35
2.8.3	Coomassie – Färbung (modifiziert nach Weber und Osborn, 1969).....	36
2.8.4	Transfer von Proteinen auf Nitrosezellulose (Towbin et al. 1992).....	36
2.8.5	Immundetektion von Proteinen durch „Enhanced Chemiluminescence (ECL)“ .....	37
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>38</b>
3.1	Lichtmikroskopische Verteilung der Immunreaktivität von Neuroligin 1, Synaptophysin und S100 im Nucleus facialis.....	38
3.1.1	Verteilung der untersuchten Proteine im Nucleus facialis von Kontrolltieren.....	38
3.1.2	Lichtmikroskopische Verteilung der untersuchten Proteine im Nucleus facialis nach Fazialisaxotomie.....	39
3.2	Lichtmikroskopische Verteilung der Immunreaktivität von Neuroligin 1, Synaptophysin und S100-Protein im Neokortex.....	45
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>61</b>
4.1	Methodische Einschränkungen.....	61
4.2	Lichtmikroskopische Veränderungen nach Fazialisaxotomie .....	62
4.2.1	Strukturelle Veränderungen nach Fazialisaxotomie im Nucleus facialis .....	63
4.2.1.1	Neuronale Reaktionen auf Fazialisaxotomie im Nucleus facialis.....	63
4.2.1.2	Synaptische Plastizität nach Nervenläsion.....	66
4.2.1.3	Synaptic stripping.....	68
4.2.1.4	Reaktion von Astrozyten auf Axotomie.....	70
4.2.2	Lichtmikroskopische Veränderungen im Motorkortex nach Fazialisaxotomie.....	71
4.2.2.1	Der retrograde Weg.....	73
4.2.2.2	Der anterograde Weg.....	74
4.2.2.3	Neuronale Veränderungen im Motorkortex (MI) nach Fazialisaxotomie.....	75
4.2.2.4	Durch Fazialisaxotomie induzierte Veränderungen auf gliöser Ebene.....	78
4.2.2.5	Neuroligin1/Synaptophysin-Immunreaktivität im Motorkortex.....	82
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>85</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BDNF: **brain-derived neurotrophic factor**

Cx-43: **Connexin-43**

DAB: **Diaminobenzidin**

dest.: **destilliert**

EDTA: **Ethylendiamintetraacetat**

GABA: **gamma-aminobutyric acid** (engl.)

GDNF: **glial cell line-derived neurotrophic factor** (engl.)

GFAP: **glial fibrillary acidic protein** (engl.)

IR: **Immunreaktivität**

LTD: **long-term depression** (engl.)

LTP: **long-term potentiation** (engl.)

MI: **primär motorischer Kortex**

N.: **Nervus** (lat.)

NGF: **nerve growth factor**

NGS: **normal goat serum** (engl.)

NL1: **Neuroigin 1**

nNOS: **neuronal-nitric oxide synthase** (engl.)

PB: **phosphate-buffer** (engl.)

PBS: **phosphate-buffered saline** (engl.)

p.o.: **postoperativ**

S100: **S100-Protein**

SDS-Page: **sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis** (engl.)

SI: **primär somatosensorischer Kortex**

STD: **short-term depression** (engl.)

STP: **short-term potentiation** (engl.)

TBS: **tris-buffered saline** (engl.)

t-PA: **tissue-type plasminogenactivator** (engl.)

TPBS: **tris and phosphate-buffered saline** (engl.)

ÜZ: **Überlebenszeit**

u-PA: **urokinase-type plasminogenactivator** (engl.)

V-MI: **Vibrissen-Motorkortex**

VPM-Kern: **Nucleus ventralis posteromedialis thalami** (lat.)

ZNS: **zentrales Nervensystem**

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Thema und klinische Relevanz

Die vorliegende Arbeit sucht auf dem Wege der Betrachtung von Vorgängen nach einer Nervenläsion Zugang zum Thema "Neuroplastizität des Nervensystems".

Neuroplastizität ist eine unspezifische neurowissenschaftlicher Bezeichnung für die fundamentale Eigenschaft des zentralen Nervensystems (ZNS) und seiner Neurone und neuronalen Netzwerke, sich als Reaktion auf verschiedenste äußere Einflüsse strukturell und funktionell zu verändern (Shaw und McEachern 2001).

Solche äußeren Einflüsse können in Form neuer Information, sensorischer Stimulation, im Zuge der Individualentwicklung, aber auch in Form von strukturellen oder funktionellen Schädigungen auftreten. Neuroplastizität kann alle Ebenen des ZNS betreffen und reicht von zellulären Veränderungen bis zum Umbau kortikaler Repräsentationskarten, beispielsweise als Folge von Verletzungen. Obwohl neuronale Netzwerke modular aufgebaut und so jeweils für spezifische Funktionen zuständig sind, behalten sie die Fähigkeit, von ihren gewohnten Funktionen abzuweichen und sich neu zu organisieren. Hierbei wirksame Vorgänge spielen bei unterschiedlichsten Umbau- und Adaptationsprozessen eine wichtige Rolle. Dabei scheint die Wechselbeziehung zwischen Gliazellen und Synapsen besonders wichtig zu sein.

Die Erforschung der Grundlagen und Möglichkeiten der Neuroplastizität interessiert in so unterschiedlichen Zusammenhängen wie 'Lernen und Gedächtnistraining', 'Phantom-Phänomene (z.B. nach Amputationen)', 'Rehabilitation verlorener motorischer oder sensorischer Funktionen nach Schlaganfall', 'Behandlung nach Nerven- oder Rückenmarksverletzungen', 'kortikale Schädigungen' und 'Umbauprozesse in intakten Anteilen des zentralen Nervensystems nach peripheren Nervenläsionen'. Immer geht es dabei im Kontext von Personen- und Umweltfaktoren um das Funktionieren gestörter Körperstrukturen und -funktionen mit dem Ziel von Aktivität und Partizipation am Leben in der Gemeinschaft, wie die ICF (Internationale Klassifikation der Funktionsfähigkeit, Behinderung und Gesundheit) der WHO besagt (WHO 2001).

Speziell befasst sich die vorliegende Arbeit mit Reorganisationsvorgängen im ZNS der Ratte nach

peripherer Nervenläsion. Untersucht werden funktionell bedingte morphologische Veränderungen im Hirnstamm und im Neokortex nach Axotomie des Nervus facialis adulter Ratten. Die mit solchen Reorganisationsvorgängen verbundenen plastischen Umbauprozesse betreffen unter anderem die Dynamik und Morphologie von Synapsen und Glia.

Es ergibt sich folgende Fragestellung:

- I Lassen sich nach Nervendurchtrennung morphologische Veränderungen in Hirnstamm und Neokortex nachweisen?
- II Wie sehen diese Veränderungen aus?
- III Finden sich bei Betrachtung mehrerer gleichartig geschädigter Individuen vergleichbare Reaktionsmuster?
- IV Stellt der gewählte Weg einen brauchbaren Zugang zur Erforschung der Phänomene der Neuroplastizität dar?

## **1.2 Zum Grundverständnis der verwendeten Begriffe**

Zum Verständnis der verwendeten Begriffe und untersuchten Vorgänge werden die Grundlagen der Sensomotorik, der Nerven-anatomie, der neuronalen Plastizität und in diesem Zusammenhang besonders die Grundlagen der Synapsenplastizität dargestellt.

### **1.2.1 Grundlagen der Sensomotorik**

Zielgerichtete Motorik setzt sogenannte Afferenzen, sensorische Informationen des Körpers und seiner Umgebung, voraus (Brodal 1992). Die sensorischen Afferenzen werden zentral in die Generierung der Zielmotorik integriert (sensomotorische Integration). Das Zusammenspiel von Muskeln und Muskelsystemen bei der Generierung willkürlicher Bewegungen oder wechselnder Körperhaltungen in einer sich ständig verändernden Umwelt erfordert eine große räumlich-zeitliche Anpassungsfähigkeit des Zentralen Nervensystems (ZNS). Diese wird durch spezielle neuronale Innervationsmuster mit gewährleistet. Die Innervation der Skelettmuskulatur obliegt dabei den Motoneuronen, deren Aktivität durch motorische Zentren auf verschiedenen Ebenen des ZNS (Rückenmark, Hirnstamm, Mittelhirn und Zerebralkortex) reguliert wird. Informationen über den aktuellen Zustand, z.B. Länge und Vordehnung der zu aktivierenden oder hemmenden Muskeln, werden über Muskelspindeln und Sehnenorgane bzw. Hautrezeptoren registriert und den entsprechenden motorischen Zentren über den so genannten afferenten Schenkel zugeleitet. Eine Beeinflussung der Bewegung kann auf verschiedenen ZNS-Ebenen erfolgen. So können neben Einschaltung verschiedener langer Reflexschleifen auf spinaler Ebene auch (neo-)kortikale Strukturen einbezogen werden.

Auf spinaler Ebene erfolgt die sensomotorische Integration über mono- und polysynaptische Reflexe. Dabei werden sensorische Afferenzen entweder direkt oder über Interneurone und andere Binnenzellen, welche bis zu mehrere Segmente überbrücken können, auf den efferenten Schenkel umgeschaltet. Dieser wird durch Motoneurone gebildet, welche mit den von ihnen innervierten Muskelfasern zusammen die „motorische Einheit“ darstellen (Brodal 1992). Ein adäquater, durch die Motoneurone vermittelter Reiz kann hierüber eine einfache Muskelzuckung, gegebenenfalls auch komplexere Bewegungsautomatismen auslösen. Den auf spinaler Ebene auslösbaren Eigen-



und Fremdre reflexen entsprechen im Mittelhirn stato- und optokinetische Reflexe. Mit ihrer Hilfe können, unter Einbezug einer multisensorischen Konvergenz, vor allem kutaner, visueller und vestibulärer Afferenzen, Korrekturen der Tonusverteilung der Körpermuskulatur vorgenommen (Haltere reflexe) oder die orthostatische Körperstellung wieder eingenommen (Stellreflexe) werden. Solche Reflexe sind polysynaptisch, ihr afferenter Schenkel ist in der Regel hochkomplex zusammengesetzt (z.B. Afferenzen aus der Nackenmuskulatur aus dem Vestibularorgan). Ihr efferenter Schenkel beinhaltet extrapyramidale Neuronkaskaden. Das heißt, den auf spinaler Ebene liegenden, lokalen Reflexmechanismen werden lange supraspinale Funktionsschleifen zugeordnet die im Wesentlichen der Stützmotorik dienen. Sie können zudem in zweckgebundene Zielmotorik eingebunden werden. Wie die spinalen Reflexe laufen sie subkortikal und unbewusst ab.

Auch im Rahmen komplexer Willkürbewegungen erfolgt eine ständige somatosensorische Rückkopplung, welche durch intensive assoziative Verbindungen zwischen dem somatosensorischen und dem motorischen Kortex gewährleistet ist (Brodal 1992, Paxinos 1995). Dies ermöglicht dem Organismus eine Einbindung äußerer Reize in bereits aktivierte Bewegungsprogramme. Im Vergleich zu spinalen und mesenzephalen Reflexen sind kortikal vermittelte Bewegungen wesentlich vielgestaltiger. Sie unterliegen, abhängig von der Häufigkeit ihres Gebrauchs, einer neuronalen Modifikation, somit ergeben sich Lerneffekte. Die transkortikale Afferenzverarbeitung hat einen modulierenden Einfluss auf kortikal generierte komplexe Bewegungsmuster. So können selbst komplexe Bewegungs- und Verhaltensmuster einer sich kontinuierlich verändernden äußeren und inneren Umwelt angepasst werden. Die Ausführung hochkomplexer Willkürbewegungen, wie etwa feinmotorische Handbewegungen, erfordert neben der Aktivierung verschiedenster Muskeln auch die Hemmung von deren Antagonisten sowie die Einbindung afferenter Informationen. Solche Bewegungen unterliegen im primär motorischen Kortex (MI) einer somatotopischen Organisation (Sanes und Donoghue 1997). Das bedeutet, dass die gesamte Körpermuskulatur topographisch repräsentiert ist, d.h. dass spezifische Muskelgruppen - sofern durch die entsprechenden Kortexgebiete neuronal angesteuert - spezifische Bewegungen verursachen. Aus dem ebenfalls somatotop organisierten, primär somatosensorischen Kortex (SI) erhält der MI die für die Zielbewegung erforderlichen afferenten Informationen. Des Weiteren kann der SI den Muskeltonus durch einen hemmenden Einfluss auf verschiedene Reflexe beeinflussen. Nur durch das Zusammenwirken aller genannter Faktoren ist die Generierung feinsten Bewegungen gewährleistet.

### **1.2.2 Aufbau eines peripheren Nerven**

Das Verständnis von Anatomie und Physiologie eines peripheren Nerven ist die Bedingung für die morphologische Bewertung neuronaler Präparate. Eine Überprüfung auf lichtmikroskopisch feststellbare Abweichungen dient in dieser Arbeit als Grundlage für die Beurteilung von Veränderungen der untersuchten neuronalen Strukturen nach Fazialisaxotomie.

Ein Neuron lässt sich in Perikaryon (Zelleib), Dendriten und das Axon (Neurit) unterteilen. Die Gesamtheit der Dendriten bilden die afferente Komponente der Nervenzelle, während das Axon die efferente Komponente darstellt. Es leitet die neuronale Erregung in die Peripherie. Das Axon kann beim Menschen eine Länge von bis zu 1 m erreichen. Je nach Differenzierung der Axonhülle kann man markscheidenhaltige und markscheidenlose Nervenfasern unterscheiden (Kuczynski 1980). Der in dieser Arbeit untersuchte Nervus facialis (N. facialis) enthält, wie die meisten peripheren Nerven, markscheidenhaltige Fasern.

Die Markscheide weist einen lamellaren Bau auf. Die eigentliche Substanz dieser Schicht, die der elektrischen Isolierung dient, ist das Myelin. Es besteht zu 70% aus Lipiden (Phospholipiden, Cholesterin und Glycolipiden) und ist zu 30% aus einer Anzahl verschiedener Proteine zusammengesetzt. Die Proteine spielen bei der Bildung, Erhaltung und Degeneration der Myelinscheiden eine wichtige Rolle (Quarles 2002).

### **1.2.3 Pathophysiologie der peripheren Nervenläsion**

Bei der Axotomie eines Nerven erfolgt eine vollständige Unterbrechung der Nervenkontinuität. Klinisch liegt nach einer solchen Nervenläsion eine Parese der jeweiligen betroffenen Muskulatur vor. Das Elektromyogramm zeigt eine vollständige Unterbrechung der Nervenleitung mit verlangsamter Muskelkontraktion. Distal der Nervenläsion tritt die von August Waller 1850 beschriebene sekundäre Degeneration (Waller'sche Degeneration) auf, bei der es sowohl zu De- als auch zu Regenerationsvorgängen kommt (Fawcett und Keynes 1990).

Während der Phase der Degeneration weisen Form und Durchmesser der Myelinscheiden histologische Unregelmäßigkeiten auf. Es resultiert eine Quellung und Invagination der Myelinscheiden mit einer Aufsplitterung der äußeren Lamellen. Innerhalb einer Woche zerfallen die

Markscheiden. Durch Lysophosphatide erfolgt schließlich eine Auflösung der Axone. Der weitere Prozess beinhaltet die Entmischung und Verklumpung des Axoplasmas, eine diffuse Granulierung der axonalen Mitochondrien, die Aufnahme von Markfragmenten in die Schwann'schen Scheiden und das Auftreten von Fettkörnchenzellen. Es kommt zur Markballenbildung (Zierz und Tackmann 1989).

Anschließend werden die Myelinfragmente durch Makrophagen abgebaut. Es bildet sich zudem ein Milieu aus, in dem regenerative Prozesse ablaufen können (Küry et al. 2001). Durch Proliferation der Schwann'schen Zellen und Bildung feiner Fibrillen vom Axon des proximalen Nervenstumpfes aus beginnt die Regeneration mit einer Geschwindigkeit von 1-2 mm/Tag (Quan und Bird 1999).

#### **1.2.4 Neuronale Plastizität**

Neuronale Plastizität bezeichnet die Eigenschaft von Synapsen, Nervenzellen oder auch ganzen Hirnarealen, ihre Eigenschaften in Abhängigkeit von ihrer Aktivität zu verändern. Entsprechend dem betreffenden System spricht man von kortikaler oder synaptischer Plastizität. Zunächst soll hier auf neuroplastische Vorgänge während der Individualentwicklung eingegangen werden.

##### **1.2.4.1 Entwicklungsplastizität**

Grundlage für die anatomische und die funktionelle Organisation des somatosensorischen wie auch des motorischen Systems ist die topographisch angeordnete Repräsentation peripherer Rezeptoren bzw. Muskelgruppen im Kortex. Ihre Lokalisation in der Körperperipherie wird während der Ontogenese in die verschiedenen ZNS-Ebenen (Relaiskerne des Hirnstamms, Thalamus, somatosensorischen und motorischen Kortex) eingeprägt (O'Leary et al. 1994).

Die Ausbildung einer normalen topographischen Repräsentation im zentralen Nervensystem hängt entscheidend von der Intaktheit und Anordnung der peripheren Komponenten, d.h. der Topographie der Rezeptoren bzw. der Zielmuskulatur, aber auch von der Integrität der ascendierenden und descendierenden Nervenverbindungen im ZNS ab. Störungen in der Peripherie und auf höheren Schaltebenen während der Ontogenese können zu Veränderungen der betroffenen somatosensorischen bzw. motorischen Repräsentationen führen. Es ist bekannt, dass die Ontogenese

des somatosensorischen Systems sensible Phasen („critical periods“) aufweist, während derer eine erhöhte Vulnerabilität des ZNS gegenüber Manipulationen in der Peripherie besteht (Kaas et al. 1983). Stört man in solchen Phasen bei der adulten Ratte die periphere Innervation einzelner Vibrissen, so verändert sich hierdurch deren somatosensorische Repräsentation im Hirnstamm (Chiaia et al. 1992) und im primären somatosensorischen Kortex (SI) (Killackey et al. 1994). Das denervierte Gebiet wird dann von den Nachbarrepräsentationen mitbesetzt. Außerhalb dieser kritischen Phasen haben Manipulationen einen wesentlich geringeren Einfluss auf die zentralen somatosensorischen Repräsentationen. Neonatale Manipulationen können zu einer Reorganisation auch motorischer Repräsentationen führen (Donoghue und Sanes 1987).

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für neuroplastische Vorgänge während der Ontogenese ist die übermäßige Ausbildung sogenannter transientser Synapsen. Solche Synapsen werden normalerweise im Rahmen der Individualentwicklung wieder abgebaut, können aber unter pathologischen Bedingungen erhalten bleiben (Wolff und Missler 1992). So werden während der Ontogenese intrakortikale, kommissurale (Innocenti 1981, Innocenti und Clarke 1984, Killackey und Chalupa 1986) und assoziative (Ivy und Killackey 1982, Killackey et al. 1983) Verbindungen mit Kortexgebieten beobachtet, die nach einer normalen Entwicklung im adulten Tier nicht mehr vorhanden sind. Bei der Elimination überzähliger Synapsen spielen trophische Faktoren (Schwartz 1992) eine große Rolle, die zur selektiven Stabilisierung synaptischer Verbindungen führen (Changeux und Danchin 1976).

#### **1.2.4.2 Kortikale (Repräsentations-)Plastizität**

Kortikale Plastizität bezeichnet die aktivitätsabhängige Änderung der Größe, Konnektivität und Aktivierungsmuster kortikaler Netzwerke. Das Prinzip der kortikalen Repräsentationsplastizität besagt, dass die Funktionen eines bestimmten Kortexareals sich in ein anderes Areal „verschieben“ können. Kortikale Repräsentationen des Körpers, die während der Ontogenese durch einen hohen Grad an Plastizität an die individuelle periphere Rezeptor- bzw. Muskelanordnung (Somatotopie) eines Säugetiers angepasst werden, unterliegen im adulten Individuum nach wie vor einer ständigen plastischen Modifikation (Kaas 1991, Garraghty und Kaas 1992). Der Begriff Somatotopie ist auf den von dem Neurochirurgen Wilder Penfield (1891–1976) zwischen 1940 und 1950 geprägten Begriff Somatotopik zurückzuführen. Der Begriff diente dazu, die motorischen und sensiblen

Zentren im Bereich des menschlichen Kortex und des Kleinhirns näher zu beschreiben. Penfields Kenntnisse beruhten auf der Gehirnochirurgie am geöffneten Schädel bzw. auf seiner Entdeckung, dass sich mittels elektrischer Stimulation an der Zentralfurche (Sulcus centralis) auf der einen Seite Muskelkontraktionen auslösen, auf der anderen Seite Sinneswahrnehmungen derselben Körperpartien erzeugen ließen. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl die kortikalen Repräsentationen der Körperbewegungen im primären Motorkortex, als auch die der sensiblen Informationen im primären somatosensorischen Kortex, kartenähnlich organisiert sind (Penfield und Rasmussen 1968). Im Groben zeigte sich eine von medial nach lateral verlaufende Topographie von Bein (Hinterbein beim Säugetier), Arm (Vorderbein einschließlich Finger), Kopf und Gesicht, die in Form eines verzerrten Bildes des Körpers (Homunculus) abgebildet werden kann. Der in der Fachwelt heutzutage omnipräsente Homunculus soll die Körperprojektionen im Größenverhältnis ihrer Projektionsfelder zeigen, wobei seine ursprüngliche Intention und vor allem sein heutiger wissenschaftlicher Nutzen inzwischen angezweifelt werden (Schott 1993). Mittels aktueller Methoden gewonnene Daten zeigen zwar nach wie vor eine Trennung zwischen den funktionalen Subregionen für Beine, Arme und Kopf innerhalb des Motorkortex, lehnen die Vorstellung einer präzise abgegrenzten Topographie aber eindeutig ab (Sanes und Donoghue 2000). Zudem ist für den primären Motorkortex (MI) heute bekannt, dass seine Somatotopie nicht starr, sondern plastisch, d.h. flexibel in ihrer Ausdehnung ist. So führt ein veränderter physiologischer Gebrauch von Gliedmaßen oder anderen Körperteilen zu Veränderungen von deren kortikaler somatosensorischer und motorischer Repräsentation. Dies konnte vielfach anhand von Tierexperimenten gezeigt werden. Eine künstlich erzeugte Syndaktylie kann z.B. zu einer Fusion der kortikalen somatosensorischen Repräsentation zweier miteinander verbundener Finger führen (Clark et al. 1988, Allard et al. 1991), wobei die veränderte kortikale Repräsentation durch sekundäre Trennung der Finger wieder rückgängig gemacht werden kann (Mogilner et al. 1993). Auch die verstärkte Nutzung eines einzelnen Fingers führt zur Expansion des repräsentierenden kortikalen Areals (Jenkins et al. 1990). Die Reorganisation somatosensorischer kortikaler Repräsentationen erfolgt innerhalb von Tagen bis Wochen (Merzenich et al. 1983 b). Es wurde gezeigt, dass die Somatotopie im Thalamus (z.B. im VPL-Kern) erhalten bleibt (Wang et al. 1995, Diamond et al. 1993, 1994; Armstrong-James et al. 1994). Daher wird angenommen, dass die Reorganisationsvorgänge der somatotopen Repräsentationen auf den Kortex beschränkt sind.

Auch im MI kann eine Anpassung der kortikalen Repräsentationen an veränderte äußere

Bedingungen erfolgen. Dabei spielt die somatosensorische Reafferenz des jeweiligen Körperteils eine wesentliche Rolle. Ein verstärkter sensorischer Input in den MI, der aus subkortikalen Gebieten wie dem ventrolateralen Thalamuskern und aus dem SI stammen kann, führt zu einer Ausdehnung der entsprechenden motorischen Repräsentationsareale. Diese sensorische Reafferenz kann sowohl durch physiologischen Gebrauch bedingt (Humphrey et al. 1990), als auch experimentell (Nudo und Merzenich 1987, Nudo et al. 1990, Iriki et al. 1989, Hess und Donoghue 1994) verursacht sein. Als anatomisches Korrelat der Ausdehnung kortikaler Repräsentationen motorischer Funktionen werden intrakortikale, assoziative Verbindungen angenommen, die eine flexible Anpassung der Verbindungsstärke zwischen Neuronen verschiedener motorischer Repräsentationsareale im MI ermöglichen (Sanes und Donoghue 2000, Hess und Donoghue 1994, Donoghue und Sanes 1994). Auf welche Weise genau diese Reorganisationsprozesse im MI ausgelöst werden, ist derzeit unklar.

#### **1.2.4.3 Klinische Relevanz der Neuroplastizität**

Die Deafferentierung bzw. -efferentierung von Kortexarealen kann also zu einer Reorganisation somatosensorischer und motorischer Repräsentationen führen. Diese Tatsache ist bedeutend länger bekannt als das Phänomen, dass auch physiologischer Gebrauch kortikale Plastizität induzieren kann. In verschiedensten Spezies wurden im somatosensorischen System Denervierungsstudien vorgenommen. Hierbei wurden unterschiedlichste Manipulationen eingesetzt, die von der Betäubung einer Gliedmaße (Metzler und Marks 1979) über die Durchtrennung eines peripheren sensorischen Nerven (Kalaska und Pomeranz 1979, Franck 1980, Wall et al. 1981, Merzenich et al. 1983 a, b) bis zu Amputationen von Fingern und ganzen Extremitäten (Kelahan et al. 1981, Kelahan und Doetsch 1981, 1984; Rasmusson 1982, Merzenich et al. 1984) reichten. Art und Umfang der hierdurch ausgelösten Reorganisationsprozesse zentraler somatosensorischer Repräsentationen ähnelten einander: Innerhalb von Tagen bis Wochen kam es zu einer Ausdehnung benachbarter Kortexareale mit intakter Sensorik in das deafferentierte Kortexareal hinein (Kaas et al. 1983, Merzenich et al. 1983 a,b). Anhand elektrophysiologischer Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine periphere Deafferentierung wesentlich schneller, d.h. innerhalb weniger Minuten, zu Funktionsänderungen kortikaler somatosensorischer Repräsentationen führt. Bei Ratten (Byrne und Calford 1991) und Affen (Calford und Tweedale 1991 b) konnte eine Ausdehnung benachbarter Repräsentationen in das deprivierte Kortexareal innerhalb von 5 Minuten beobachtet werden. Bei

Fledermäusen kommt es zusätzlich zu einer ähnlich gearteten Ausdehnung rezeptiver Felder in kommissural verbundene, homotope Gebiete der kontralateralen Kortexhemisphäre (Calford und Tweedale 1990, 1991 a). Dies zeigt, dass in verschiedenen Spezies offensichtlich ähnliche Mechanismen an der Reorganisation kortikaler Repräsentationen beteiligt sind.

Die kurze Latenz, mit der es nach Deafferentierung zur Reorganisation kortikaler Repräsentation kommt (Minuten bis Stunden), lässt den Schluss zu, dass neuronale Prozesse wie axonales Wachstum zumindest an den frühen kortikalen Reaktionen nicht beteiligt sein können. Daher wird angenommen, dass es zu einer Steigerung der Effektivität der synaptischen Übertragung bereits bestehender thalamo-kortikaler Afferenzen kommt, welche unter normalen Umständen relativ schwach ausgebildet sind und nun, z.B. durch eine Deafferentierung, „demaskiert“ werden (Rasmusson 1982, Merzenich et al. 1983 a, b; Wall und Cusick 1984, Pons et al. 1988). Calford und Tweedale (1991 a, b) sind der Auffassung, dass die Deafferentierung zu einem Wegfall von hemmenden Impulsen, d.h. einer Disinhibition, im somatosensorischen Kortex führt, und auf diese Weise eine Ausdehnung der rezeptiven Felder ermöglicht. Als anatomische Basis für die Expansion der rezeptiven Felder nehmen die Autoren weit verzweigte thalamokortikale Axone an, wohingegen die Ausbildung von expandierten rezeptiven Feldern im Normalfall durch lokale, hemmende Interneurone verhindert werden soll (Calford und Tweedale 1991 c). Erst wenn, z.B. durch Deafferentierung oder pharmakologische Induzierung, der „Antrieb“ dieser Interneurone wegfällt (Alloway und Burton 1991), kommt es zu der Expansion der rezeptiven Felder.

Auch beim Menschen führt das plötzliche Ausbleiben von Sinneseindrücken nach Amputation einer Gliedmaße dazu, dass die entsprechenden kortikalen Karten sich verändern. In der Regel bedeutet dies, dass der vormals einen (nun fehlenden) Körperteil repräsentierende Hirnbereich nach und nach dessen benachbarte (noch vorhandene) Körperteile mit repräsentiert. Diese Vorgänge können bei betroffenen Personen zu seltsamen Fehlwahrnehmungen führen (Sumitani et al. 2010). So führt der sogenannte Phantomschmerz bei Menschen mit amputierten Gliedmaßen dazu, dass diese weiterhin wie vorhanden gefühlt werden. Dies ist dadurch verursacht, dass die Repräsentation der amputierten Gliedmaßes im Kortex noch nicht vollends „gelöscht“ ist, aber bereits Nervensignale von benachbarten Hirnarealen in diesen Bereich eindringen. Kortikale Karten können sich auch verhaltensbedingt, zum Beispiel durch Training, verändern. So konnte Alvaro Pascual-Leone zeigen, dass die kortikalen Karten der Finger durch tägliches Training einer zweistündigen Klavierfingerübung nach einer Woche signifikant an Größe zunahmten (Cohen et al. 2005).

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass professionelle Geigenspieler oder auch trainierte Badmintonspieler im Vergleich zu Anfängern größere kortikale motorische Repräsentationen der Hand aufweisen (Pearce et al. 2000).

### **1.2.5 Synaptische Plastizität**

Entwicklung und Funktionsfähigkeit des Gehirns stehen in engem Zusammenhang mit der Ausbildung, Dauerhaftigkeit und Modifikation seiner synaptischen Verbindungen. Der Psychologe Donald Olding Hebb gilt als der Entdecker der synaptischen Plastizität. Er formulierte 1949 die Hebb' sche Lernregel in seinem Buch "The Organization of Behavior" (Hebb 1949). Für das gesunde Funktionieren des zentralen und peripheren Nervensystems ist die schnelle Signalübertragung über synaptische Verbindungen unerlässlich. Synaptische Plastizität ist ein wichtiger Forschungsschwerpunkt der Neurowissenschaften. Sie bezeichnet die physiologischen und morphologischen Veränderungen der Synapsen. Solche Veränderungen sind einerseits vom Ausmaß der synaptischen Aktivität abhängig, und haben andererseits selbst Einfluss auf das Ausmaß der synaptischen Übertragungsrates. Synaptische Plastizität spielt als neurophysiologischer Mechanismus eine entscheidende Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen. Das Ausmaß der synaptischen Übertragung einer einzelnen Synapse hängt von ihrer Aktivität bzw. der Stärke ihrer Erregung ab.

Im Zentralnervensystem erfolgt die neuronale Transmission an erregenden und hemmenden chemischen Synapsen (Zweifel et al. 2005, Ferreira und Paganoni 2002, Garner et al. 2002, Brose 1999). Chemische Synapsen sind hochkomplexe asymmetrische Verbindungsstellen zwischen Neuronen, die auf eine zeitlich und räumlich exakte Signalübertragung ausgelegt sind. Letztere wird durch die Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt initiiert, wobei mit Transmitter gefüllte synaptische Vesikel mit einem spezialisierten Bereich der präsynaptischen Membran, der so genannten "Aktiven Zone", fusionieren. Freigesetzte Neurotransmitter können von spezifischen Rezeptoren der gegenüberliegenden postsynaptischen Membran gebunden werden. Dies führt zu einer Veränderung des physiologischen Status der postsynaptischen Zelle. Ab einem bestimmten Ausmaß verursacht dies eine Weiterleitung des synaptischen Signals in Form eines Aktionspotenzials. Die Neurotransmitter-Rezeptoren sind Teil eines komplexen Proteinnetzwerkes



in der postsynaptischen Membran, das als Postsynaptische Verdichtung ("postsynaptic density") bezeichnet wird.

Jedes einzelne Aktionspotenzial bewirkt somit am postsynaptischen Neuron eine unterschiedlich ausgeprägte Änderung des Membranpotentials. Je größer diese Änderung, desto stärker die Übertragung, und umgekehrt. Eine Verstärkung der synaptischen Übertragung durch synaptische Plastizität bezeichnet man als Potenzierung, eine Abschwächung als Depression. Je nach Dauer spricht man von Langzeit-Potenzierung (LTP), Kurzzeit-Potenzierung (STP), Langzeit-Depression (LTD) oder Kurzzeit-Depression (STD).

Synaptische Plastizität kann sowohl prä- als auch postsynaptisch bedingt sein. Präsynaptische Verursachung bedeutet, dass sich die Menge des pro Aktionspotenzials freigesetzten Transmitters oder die Geschwindigkeit der Wiederaufnahme des Neurotransmitters in die präsynaptische Zelle verändert. Bei der postsynaptischen Verursachung ändert sich das Ausmaß der postsynaptischen Antwort, das durch eine bestimmte Menge von Transmitter verursacht wird. Das kann z.B. durch Änderung der Menge postsynaptischer Transmitter-Rezeptoren, durch die Modifikation dieser Rezeptoren (z.B. durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung) oder durch die Bildung von Enzymen, welche ihrerseits die Neurotransmitter im synaptischen Spalt modifizieren, der Fall sein. Prä- und postsynaptische Änderungen können gleichzeitig vorliegen. Die Art der synaptischen Plastizität bzw. der Mechanismus, über den sie erfolgt, ist spezifisch für bestimmte Synapsen und bestimmte Arten synaptischer Aktivität. Neuesten Forschungsergebnissen zufolge kann synaptische Plastizität, ebenso wie die Signaltransduktion in Neuronen, auf molekularen Prozessen basieren, in denen Hydrogenperoxid und Superoxid als molekulare Signalüberträger fungieren. (Kishida und Klann 2007).

#### **1.2.5.1 Synapsenadhäsion**

An der Synapse besteht ein spezialisierter Zell-Zell-Kontakt zwischen der auf vesikulären Verkehr spezialisierten präsynaptischen Membran mit der auf die Signalweiterleitung spezialisierten postsynaptischen Membran. Die Zuverlässigkeit und Effizienz der synaptischen Übertragung von Synapsen des reifen ZNS basieren auf ihrem spezifischen molekularen Aufbau, der durch ein reguliertes Zusammenspiel von Adhäsions-, Gerüst-, Rezeptor- und Signalproteinen gewährleistet

wird. Es konnte gezeigt werden, dass Proteine der Neuroligin-Familie bei der Synaptogenese eine wichtige regulative Funktion haben. Neuroligine sind Transmembranproteine der postsynaptischen Membran, die die Ausbildung von Synapsen zwischen Neuronen vermitteln und daher auch als postsynaptische Adhäsionsproteine bezeichnet werden (Song et al. 1999). Sie bestehen aus einer kleinen intrazellulären und einer großen extrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne weist Ähnlichkeiten zur Acetylcholinesterase auf, ist aber enzymatisch inaktiv.

Durch die direkte Interaktion mit präsynaptisch lokalisierten Neurexinen verbinden Neuroligine prä- und postsynaptisch lokalisierte Proteinnetzwerke miteinander (Dean und Dresbach 2006). Die Interaktion dieser beiden heterologen Adhäsionsproteine, der Neuroligine und Neurexine, erfolgt in Form einer Bindung ihrer jeweiligen extrazellulären Bereiche, und dient der Entstehung symmetrischer interzelluläre Verbindungen sowie der Organisation und Spezifikation verschiedener Typen von Synapsen. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass Neuroligine auch die Entstehung hemmender GABAerger und glycinерger Synapsen steuern (Graf et al. 2004). Während die der Funktion von Neuroliginen in erregenden Synapsen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen weitgehend bekannt sind, herrscht vorwiegend Unklarheit über die molekularen Mechanismen, die der Funktion von Neuroliginen an inhibitorischen Synapsen zugrunde liegen.

Es wird angenommen, dass verschiedene Spleißvarianten der extrazellulären Domäne von Neuroliginen spezifisch mit verschiedenen Neurexin-Spleißvarianten interagieren können (Meyer et al. 2004). Neurexine sind eine Familie neuronaler Zelloberflächenproteine. Es konnte gezeigt werden, dass die Expressierung von Neuroliginen an Kontakten mit Axonen eine präsynaptische Differenzierung bewirkt (Scheiffele et al. 2000). Durch die Vermittlung von transsynaptischen Signalen und die so erfolgende Spezifizierung synaptischer Funktionen können Neuroligine die Eigenschaften neuronaler Netzwerke beeinflussen.

#### **1.2.5.2 Das postsynaptische Adhäsionsmolekül Neuroligin 1**

Über das in dieser Arbeit verwendete Neuroligin 1 (NL1) ist bekannt, dass es Schlüsselschritte der präsynaptischen Reifung reguliert (Wittenmayer et al. 2009). Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen NL1 konnte neben einer synaptischen Lokalisation von NL1 gezeigt werden, dass seine subzelluläre Verteilung und entwicklungsbedingte Expressierung derjenigen des postsynaptischen Markerproteins PSD-95 und bestimmter NMDA-Rezeptoren ähnelt (Song et al.

1999). Ebenso wurde eine Ansammlung von NL1 im synaptischen Spalt und in postsynaptischen Verdichtungen gezeigt. Mit Hilfe doppelter Immunfluoreszenzfärbung konnte nachgewiesen werden, dass NL1 in exzitatorischen glutamatergen, nicht aber in GABA( $\gamma$ -Aminobuttersäure)ergen Synapsen kolokalisiert ist. Neuroligin 2 hingegen ist zumeist nur in inhibitorischen GABAergen und glycinergen Postsynapsen anzutreffen (Varoqueaux et al. 2004). Die Verteilung zweier weiterer Neuroligin-Isoformen (Neuroligin 3 und 4) wurde bislang noch nicht im Gehirn untersucht. In Primärkulturen von aus dem Hippocampus gewonnenen Neuronen findet man Neuroligin 3 sowohl in erregenden als auch in hemmenden Postsynapsen. Weitere In-vitro-Untersuchungen lassen auf eine bevorzugte Lokalisierung von Neuroligin 4 in erregenden Synapsen schließen.

### **1.2.6 Rolle von Glia bei neuromodulatorischen Vorgängen**

Glia bezeichnet strukturell und funktionell von den Neuronen abgrenzbare Zellen im Nervengewebe. Im menschlichen Gehirn gibt es etwa 10- bis 50-mal mehr Gliazellen als Neuronen (Kandel et al. 1995). Die Masse des menschlichen Gehirns ergibt sich je zur Hälfte aus Glia- und Nervenzellen, wobei das menschliche Nervengewebe im Vergleich zu Tieren erheblich mehr Gliazellen beinhaltet. Der Name Gliazellen (gr. gliocyti), abgeleitet aus dem griechischen Wort glia für „Leim“, ist auf ihren Entdecker Rudolf Virchow zurückzuführen. Mitte des 19. Jahrhunderts schrieb er den Gliazellen vor allem eine Stütz- und Haltefunktion zu. Mittels unterschiedlicher Silberimprägnation (Golgi-Färbung) durch Santiago Ramón y Cajal, Pío del Río Hortega und Camillo Golgi konnten diese Zellen Ende des 19. Jahrhunderts weiter klassifiziert werden (Kandel 2009). Fast alle Gliazellen haben, wie das gesamte Nervengewebe, ihren Ursprung im ektodermalen Keimblatt, lediglich die Mikroglia (Mesoglia) ist mesodermalen Ursprungs (Moore KL et al. 1996).

Die Astroglia oder Astrozyten bilden die Mehrheit der Gliazellen im zentralen Nervensystem von Säugetieren. Es handelt sich um sternförmig verzweigte Zellen, deren Fortsätze Grenzmembranen zur Gehirnoberfläche (bzw. Pia mater) und zu den Blutgefäßen bilden. Zwei Typen von Astrozyten sind bekannt: Zum einen die fibrillenreiche Faserglia (Astrocytus fibrosus - auch: Langstrahler), die vor allem in der weißen Substanz vorkommt und im Elektronenmikroskop durch zahlreiche Mikrotubuli und intrazelluläre Faserstrukturen charakterisiert ist (Welsch 2006), und zum anderen die protoplasmatische Glia (Astrocytus protoplasmaticus - auch: Kurzstrahler), die vor allem in der

grauen Substanz vorkommt.

Neben ihrer Funktion als Stützgerüst der Nervenzellen sind Gliazellen auch für deren elektrische Isolation verantwortlich. Um einen stabilen Informationsfluss der Nervenellen im ZNS zu gewährleisten, ist eine Regulation der extrazellulären Umgebung der Neurone von großer Bedeutung. Die Verarbeitung neuronaler Information scheint von verschiedenen Mechanismen wie z.B. der präsynaptischen Regulation der Transmitterfreisetzung und der Ausbreitung der elektrischen Weiterleitung in dendritischen Netzwerken abhängig zu sein (Henn 1982). Diese Mechanismen hängen zum Teil von der extrazellulären Konzentration von Ionen und Neuromodulatoren ab. So mag die zelluläre Matrix, in der neuronale Übertragung stattfindet, auch eine Rolle bei der Kontrolle über die Zusammensetzung der neuronalen Umgebung spielen. Astroglia bildet die Matrix, in der sich marklose Axone und synaptische Kontakte befinden, und wurde für mehrere Aspekte der Regulierung der neuronalen Umgebung verantwortlich gemacht.

Astrozyten bilden nach Durchtrennung der Axone von Nervenzellen „Glianarben“, die maßgeblich daran beteiligt sind, das neuerliche Auswachsen der Axone zu verhindern. Dies stellt ein zentrales Problem für Patienten mit Querschnittslähmung dar. In Astrozyten kommt als Marker das Intermediärfilament GFAP (glial fibrillary acidic protein, „saures Gliafaserprotein“) vor. Die Bildung dieses Proteins wird durch krankhafte Veränderungen im Hirngewebe verstärkt. Darüber hinaus zeigten neuere Erkenntnisse, dass Gliazellen maßgeblich am Stoff- und Flüssigkeitstransport, an der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirn und an der neuronalen Informationsverarbeitung, -speicherung und -weiterleitung beteiligt sind. Des Weiteren sorgen Astrozyten für die Aufrechterhaltung des Kaliumhaushaltes und regulieren damit auch den extrazellulären pH-Haushalt im ZNS. Zunächst wurde entdeckt, dass sie als Puffer für  $K^+$ -Ionen agierten. Inzwischen ist klar, dass während der neuronalen Transmitterfreisetzung in Nervenzellen frei werdende Kalium-Ionen zum einen durch eine hohe Kalium-Leitfähigkeit, zum anderen aber auch durch  $K^+$  und  $Cl^-$  Kotransporter in Astrozyten aufgenommen werden (Perea und Araque 2007). Dies verhindert einen extrazellulären Aufbau des  $K^+$ -Levels während der Weitergabe neuronaler Impulse und schützt somit benachbarte Nervenzellen vor übermäßiger Depolarisation. Da Astrozyten untereinander über zytoplasmatische Brücken (gap junctions) verbunden sind und so ein riesiges Synzytium bilden, wird das aufgenommene Kalium innerhalb des großen Volumens eines solchen Zellverbundes effektiv abgepuffert. Da Astrozyten sowohl mit Kapillaren als auch mit Nervenzellen Kontakte ausbilden, und zudem in der Lage sind, neurotrophe Faktoren freizusetzen,

erfüllen sie während regenerativer Vorgänge möglicherweise auch eine neurotrophische Funktion.

Heute werden Astrozyten als dynamische Signalelemente neuronaler Netzwerke, und neben Prä- und Postsynapse quasi als "drittes Element" neuronaler Kommunikationsvorgänge verstanden (Araque et al. 2001, Volterra und Meldolesi 2005). Das etablierte Konzept der "dreiseitigen Synapse" (tripartite synapse) bezieht sich auf die Erkenntnis, dass neben den am synaptischen Informationsfluss beteiligten prä- bzw. postsynaptischen Neuronen auch Astrozyten am Informationsaustausch mit synaptischen Elementen beteiligt sind (Abb. 1) (Perea et al. 2009).

### **1.2.7 Interaktion von Astrozyten und Neuronen**

Neuron-Astrozyten-Interaktionen spielen sowohl während der Entwicklung als auch im reifen Gehirn eine tragende Rolle (Marchetti 1997). Während der Entwicklung sind Gliazellen an der Führung neuronaler Precursor-Zellen und an der Ausstreckung neuronaler Faserprojektionen beteiligt. Inzwischen ist bekannt, dass Astrozyten im reifen Gehirn nicht nur indirekt, sondern auch direkt an der Informationsverarbeitung des Gehirns teilnehmen (Perea und Araque 2010). Sie enthalten in Vesikeln Glutamat, das bei seiner exozytotischen Freisetzung benachbarte Neurone aktiviert. Weiterhin wurde gezeigt, dass Astrozyten Transport-Systeme enthalten, die für die Entfernung einer Vielzahl von Neurotransmittern aus dem Extrazellulärraum geeignet sind. Es gibt Hinweise darauf, dass Astroglia Rezeptoren für mutmaßliche Neurotransmitter aufweist (Henn 1982). Leider ist die Kenntnis derjenigen molekularen Mechanismen, mit denen Astroglia an der Synaptogenese und der Aufrechterhaltung von Synapsen beteiligt ist, recht fragmentarisch. Die Konzeption, dass Astroglia die Bildung von Synapsen unterstützt, ergibt sich aus der bemerkenswerten zeitlichen Korrelation zwischen Synaptogenese und Differenzierung von Astrogliazellen (Pfrieger 2002). Bei Nagetieren wird Astroglia zur Zeit der Geburt generiert, während der größte Teil der Synaptogenese zwischen der ersten und dritten Woche nach der Geburt stattfindet.

Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten im Stratum radiatum hippocampaler CA1-Regionen, dass 57% der Axon-Spine-Verbindungen mit astrozytären Prozessen besetzt sind (Ventura und Harris 1999). Darüber hinaus ergaben physiologische Untersuchungen, dass die Aktivität von Neuronen zur Aktivierung astrozytärer Rezeptoren führen kann, wodurch deren internes Kalzium mobilisiert

wird. Eine Erhöhung astrozytären Kalziums führt zu einer Freisetzung chemischer Transmitter, was einen modulatorischen Einfluss auf benachbarte Neuronen nehmen kann (Araque et al. 2001, Volterra und Meldolesi 2005).

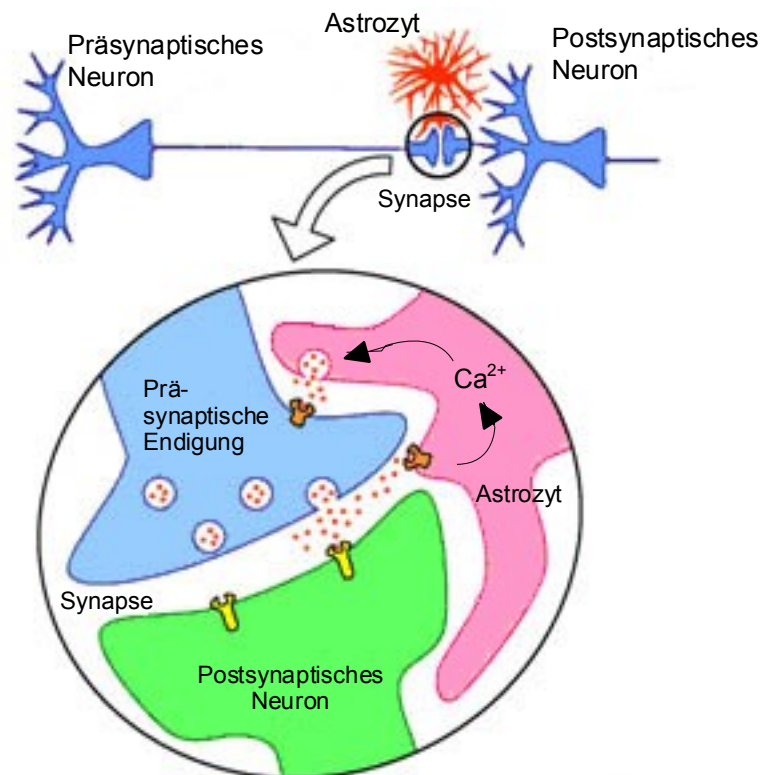
Die ersten Hinweise dafür, dass Astroglia einen Einfluss auf die Synaptogenese und die Synapsenfunktion hat, fanden sich in einer 1997 veröffentlichten Studie: Pfrieger und Barres zeigten, dass sich die Freisetzung von Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln von Neuronen in Kulturen in Anwesenheit von Gliazellen vermehrte; daraus wurde geschlossen, dass Signale von Gliazellen für die volle Funktionalität dieser Neurone erforderlich waren (Pfrieger und Barres 1997). 2001 zeigten Ullian et al., dass Astrozyten die Anzahl reifer, funktioneller Synapsen von ZNS-Neuronen erhöhen und *in vitro* für den Erhalt von Synapsen erforderlich sind. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die meisten Synapsen gleichzeitig mit der Entwicklung der Gliazellen *in vivo* ausgebildet werden (Ullian et al. 2001). Durch eine weitere Gruppe konnte ein zu Apolipoprotein E komplexiertes Cholesterin als einer der Faktoren identifiziert werden, die die Synaptogenese im ZNS fördern (Mauch et al. 2001).

Astrozyten können außerdem von Nervenzellen freigesetzte Neurotransmitter mit hoher Affinität aufnehmen. So wird z.B. Glutamat hauptsächlich von Astrozyten aus dem synaptischen Spalt entfernt. Von der Gruppe um R. Klein wurde gezeigt, dass Astrozyten den Informationsaustausch zwischen Nervenzellen beeinflussen und so den Aufbau von Zellkontakten fördern können (Filosa et al. 2009). Die Astrozyten regulieren die Menge des Transmitters Glutamat im synaptischen Spalt, indem sie ihn reduzieren. Klein et al. zeigten, dass die nachgeschaltete Nervenzelle und der Astrozyt dabei miteinander kommunizieren und so die Menge der Glutamat-Transporter reguliert wird. Hierbei spielen das Signalmolekül EphrinA3 und sein Bindungspartner, das EphA4, eine Rolle. Es ist bekannt, dass Astrozyten über EphrinA3/EphA4 auch die Reifung von Synapsen fördern (Perea et al. 2009, Araque 2008).

Ebenfalls aus Astrozyten stammt der für die synaptische Funktion wichtige Faktor TNF $\alpha$ . Er fördert die synaptische Effektivität durch eine verstärkte Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren (Beattie et al. 2002). Es wurde gezeigt, dass eines der Proteine der Extrazellulärmatrix, Thrombospondin 1/2, die Bildung von Synapsen beeinflusst (Christopherson et al. 2005).

### 1.2.8 S100-Proteine

Die S100-Proteine (S100) gehören zu den  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -bindenden Proteinen und kommen überwiegend in Astrozyten vor (Moore BW 1988, Donato 1991). Sie können jedoch auch in einer Subpopulation kortikaler Neurone nachgewiesen werden (Rickmann und Woff 1995 a). Die S100-Proteine setzen sich aus zwei Untereinheiten zusammen ( $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette). Aus dem Hirngewebe wurden in erster Linie die Dimere S100a ( $\alpha\beta$ ) und S100b ( $\beta\beta$ ) isoliert, wobei es zwischen den verschiedenen Spezies große Unterschiede in den relativen Anteilen beider Dimere gibt. Das Rattengehirn enthält zu 95% das Dimer S100b (Rickmann und Wolff 1995 b). Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit Antikörper gegen S100b verwendet. Man schreibt den S100-Proteinen zahlreiche sowohl intra-, als auch extrazelluläre Funktionen zu. Intrazellulär soll es u.a. die Proteinphosphorylierung, die ATPase-, Adenylatzyklase sowie die Aldolaseaktivität steuern. Ferner ist es an der Regulation intrazellulärer Zytoskelettstrukturen beteiligt. Extrazellulär soll es u.a. die Proliferation von Gliazellen stimulieren. Welche Rolle die S100-Proteine im Rahmen plastischer Veränderungen des Kortex spielen, ist derzeit unklar. In dieser Studie wird es, in Anlehnung an vorangehende Studien, als Marker für morphologische Reaktionen im Motorkortex (MI) und im Nucleus facialis (Nuc 7) nach Durchtrennung des N. facialis verwendet (Laskawi et al. 1997).



**Abb. 1:** Schema der “dreiteiligen Synapse” (tripartite synapse), modifiziert nach Perea und Araque (2009), S. 423. Das Schema repräsentiert den Transfer von Information zwischen neuronalen Elementen und Astrozyten an der Synapse. Astrozyten reagieren mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung auf Neurotransmitterausschüttung während synaptischer Aktivität. Sie kontrollen neuronale Erregbarkeit und die synaptische Transmission durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Ausschüttung von Gliotransmitter.



## **1.3 Anmerkungen und Voraussetzungen zum Versuchsmodell**

### **1.3.1 Der Nervus facialis als Versuchsmodell**

Wie bereits erläutert, besagt das Prinzip der kortikalen Repräsentationsplastizität, dass sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen eine ständige Adjustierung der kortikal lokalisierten, motorischen Bewegungsgeneratoren an sich wandelnde äußere und innere Rahmenbedingungen eines Organismus erfolgt. Darüber, welche Anpassungsprozesse im pathologischen Falle, etwa bei der Läsion eines peripheren Nervs, auf den verschiedenen Ebenen des ZNS erfolgen, ist wenig bekannt. Ein experimenteller Ansatz zur Erforschung dieser Anpassungsprozesse erfordert ein Modell, bei dem das somatosensorische Feedback günstigerweise getrennt von der motorischen Innervation manipulierbar ist, und somit eine möglichst systematische und detaillierte Untersuchung neuronaler Reaktionen auf den verschiedenen ZNS-Ebenen ermöglicht. Manipulationen an gemischten peripheren Nerven sind wenig sinnvoll, da diese sowohl sensorische als auch motorische Nervenfasern enthalten. Dies begründet auch M. Landgrebe in seiner Dissertation ausführlich (Landgrebe 1997). Nach Landgrebe ist die oben genannte Problematik beim Nervus facialis (N. facialis) nicht gegeben. Denn er bietet den Vorteil, dass er, ausgenommen die den Ramus auricularis posterior bildenden Anteile, keine afferenten Fasern enthält (Semba und Egger 1986). Jegliche das Gesicht betreffende, afferente Information, etwa Hautberührungen oder der Tonus der mimischen Muskulatur, wird über den Nervus trigeminus vermittelt. Eine Rückkopplung auf die Motoneurone des N. Facialis erfolgt u.a. auf der Ebene des Hirnstamms im Fazialiskern. Eine extrakranielle, auf Ebene des peripheren Nervensystems erfolgende Läsion des N. facialis hat außerdem den Vorteil, dass sie kein direktes ZNS-Trauma verursacht, also nicht zu einer Verletzung der Bluthirnschranke führt. Somit ist eine durch diesen Eingriff folgende, direkte Manipulation anatomischer Strukturen im Hirnstamm, unter anderem der Astrozyten, ausgeschlossen. Das N. facialis-Versuchsmodell in Ratten und Mäusen stellt heute eines der häufigst genutzten Tiermodelle dar, um neuronale Regeneration und Degeneration im ZNS in vivo zu untersuchen (Graeber et al. 1998). Von Georg Kreutzberg eingeführt, hat das Fazialisnerv-Axotomie-Modell inzwischen einen so hohen Bekanntheitsgrad innerhalb der neuroanatomischen Forschung erlangt, dass der Terminus "Kreutzberg Modell" für dieses Paradigma vorgeschlagen wurde (Graeber et al. 1997). In der neuroanatomischen Abteilung der Georg-August-Universität

Göttingen wurde das Modell von R. Laskawi und J. Wolff etabliert.

Der N. facialis hat drei Ursprungskerne, die den motorischen, sensorischen und parasymphathischen Qualitäten des Nervs entsprechen. Der Nucleus originis nervi facialis ist der motorische Ursprungskern. Er besteht aus einem Hauptkern für die mimische Muskulatur und den Musculus stylohyoideus, sowie aus zwei akzessorischen Kernen (Taverner 1974). Für die parasymphathischen Anteile ist der Nucleus salivatorius superior verantwortlich. Die afferenten Geschmacksfasern aus der Chorda Tympani enden im Nucleus tractus solitarii. Die sensorischen und parasymphathischen Faserbündel bilden den Nervus intermedius und verlassen den Hirnstamm getrennt vom motorischen Hauptstamm (Banfai 1976). Der N. facialis verlässt mit dem N. vestibulochlearis den Hirnstamm im Kleinhirnbrückenwinkel, tritt in den Meatus acusticus internus ein und erreicht dort den Canalis facialis des Felsenbeins. Durch eine fast rechtwinklige Biegung an der vorderen Felsenbeinwand nach dorsal bildet er das Geniculum n. facialis. Bogenförmig zieht der Nervus facialis um das Tympanon nach kaudal. Es besteht hier eine enge topographische Beziehung mit dem Sinus sigmoideus (Aslan et al. 2001).

Der Nucleus facialis befindet sich im Hirnstamm und ist bei der Ratte etwa 1,7 mm lang und 1,5 mm breit (Watson CR et al. 1982). Jeder Kern enthält zwischen 3200 und 6500 Motoneurone. Einige Gruppen fazialer Motoneurone innervieren die Muskeln, welche bei der Ratte die Bewegungen der Schnurrhaare kontrollieren (Semba und Egger 1986), und im Menschen entsprechend die Gesichtsmuskulatur. Die topographische Anordnung der Motoneurone hängt von den unterschiedlichen Versorgungsgebieten der peripheren Nervenäste ab (Tsai et al. 1993). In der Ratte weisen die topographischen Karten eine genaue Anordnung dieser Subnuclei, wobei die Motoneurone welche die rostralen Muskeln versorgen lateral lokalisiert sind, während diejenigen welche die kaudalen Muskeln versorgen, medial lokalisiert sind (Watson CR et al. 1982).

Anders als beim Menschen beinhaltet die mimische Muskulatur der Ratte eine wichtige Funktion bei der räumlichen Orientierung sowie dem aktiven Positionieren der Schnurrhaare („Vibrissen“) (Lee und Woolsey 1975, Wineski 1985, Brecht et al. 1997). Einige Nager (z.B. Ratten, Hamster, Mäuse) generieren rhythmische, ultraschnelle Bewegungen mit ihren Schnurrhaaren, das sogenannte "whisking". Obwohl solche Bewegungen typischerweise synchron sind, wurden in Ratten auch kleine divergierende Bewegungen angrenzender Schnurrhaare beschrieben (Sachdev et al. 2002). Schnurrhaarprotraktionen werden durch Schnurrhaarmuskeln vermittelt, welche in Form einer Schlinge um die Basis eines jeden Schnurrhaares positioniert sind (Dörfl 1982). Die

Retraktion der Schnurrhaare werden hingegen durch extrinsische Schnurrhaarmuskeln verursacht, welche unter der Haut liegen (Wineski 1985, Berg und Kleinfeld 2003 a, b). Diese Muskeln sind in den betreffenden Nagern hochspezialisiert, wobei die Anzahl der schnell kontrahierenden Muskelfasern überwiegt (Jin et al. 2004). Angesichts der großen Bedeutung der Schnurrhaare für das Verhalten der Tiere ist es nicht überraschend, dass ein großes kortikales Motorfeld, der "Vibrissenmotorkortex", für die Kontrolle dieser Bewegungen verantwortlich ist (Hall and Lindholm 1974). Der "Vibrissenmotorkortex" besetzt bis zu 45 % des gesamten Rattenmotorkortex (MI) und ca. 4,5 % des Gesamtvolumens des Neokortex und Allokokortex der Ratte (Wree et al. 1992, Brecht et al. 2004 b). Bemerkenswerterweise kann extrazelluläre Mikrostimulation des VMC Bewegungen evozieren, welche auf eine oder zwei Schnurrhaare beschränkt sind (Izraeli and Porter, 1995; Brecht et al., 2004 b). Dies weist auf eine funktionale Verbindung zwischen fokaler VMC-Aktivierung und Bewegungen einzelner Schnurrhaare hin. Wie die meisten Nager können Ratten sich anhand des Tastsinnes durch ihre Schnurrhaare ihre Umgebung erschließen. Dabei führen sie komplexe Orientierungs- und Diskriminierungstasks durch (Hutson und Masterton 1986, Guic-Robles et al. 1989; Brecht et al. 1997, Diamond et al. 2008). Die Vibrissen befinden sich im Bereich der Oberlippenhaut und können durch Muskeln bewegt werden. Die motorische Innervation erfolgt durch den N. Facialis. Jede Wurzel dieser Haare enthält ein komplexes, aus zahlreichen Rezeptoren bestehendes Sinnesorgan, das sein Reizmuster über den N. trigeminus dem somatosensorischen System im Hirnstamm und im Vorderhirn vermittelt. Hierbei herrscht eine exakte somatotope Rückkopplung, d.h. die Neurone im Kortex, die eine Bewegung einer Vibrisse hervorrufen, erhalten von genau dieser Vibrisse durch den N. trigeminus ein somatosensorisches Feedback (Paxinos 1995). Die Bedeutung dieses Sinnesorgans spiegelt sich auch in seiner sehr großen Repräsentation in Form des „Barrelkortex“ im SI wieder (Welker und Woolsey 1974).

Die konsequente Trennung zwischen somatosensorischer Afferenz (N. trigeminus) und motorischer Innervation (N. facialis) sowie ein guter operativer Zugang zu beiden Nerven prädestinieren dieses System für Versuche, in denen experimentell der Einfluss des afferenten und des efferenten Schenkels auf transkortikale Funktionsschleifen untersucht werden soll. Eine Verbindung zwischen trigeminalem und fazialem System besteht auf Hirnstammebene im Fazialiskern, wo eine Rückkopplung des Nervus trigeminus auf Motoneurone des N. facialis erfolgt. Auch auf kortikaler Ebene bestehen Assoziationen vom somatosensorischen Kortex (SI) zum Motorkortex (MI) (Paxinos 1995). Inwiefern im Thalamus ähnliche Verbindungen vorhanden sind, ist unklar.

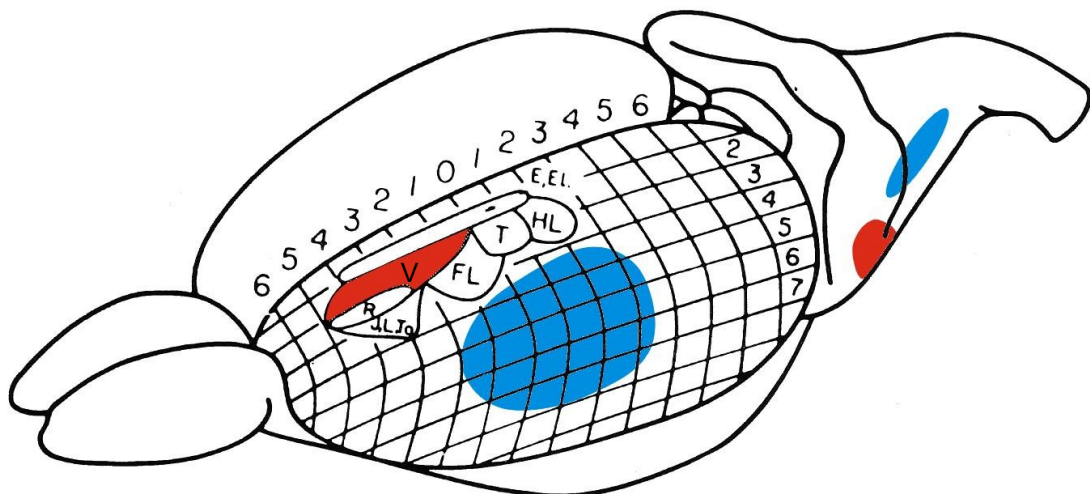
### **1.3.2 Der Verlauf des Nervus facialis beim Menschen und bei der Ratte und seine anatomische Darstellbarkeit**

Im Canalis facialis zweigen vom N. facialis der N. stapedius, der den gleichnamigen Muskel versorgt, die Chorda tympani, sowie der Ramus communicans cum plexu tympanico ab. Letzterer nimmt aus dem Plexus tympanicus des Nervus glossopharyngeus und dem Ramus auricularis nervi vagi sensible Afferenzen auf. So ist er an der sensiblen Innervation der Schleimhaut der Paukenhöhle und der Haut des äußeren Gehörganges beteiligt (Eshraghi et al. 2002). Durch das Foramen stylomastoideum verlässt der siebte Hirnnerv den Canalis facialis. Kurz nach dem Austritt gibt er den N. auricularis posterior nach dorsal ab und versorgt die Muskeln der inneren Ohrmuschel. Nach kaudal gibt er den Ramus stylohyoideus und den Ramus digastricus ab, sie versorgen die gleichnamigen Muskeln. Der N. facialis tritt in die Glandula parotis ein und verzweigt sich hier im Plexus parotideus, welcher die Ohrspeicheldrüse in einen oberflächlichen und einen tiefen Anteil aufteilt. Verglichen mit den anatomischen Verhältnissen des menschlichen N. facialis verläuft dieser Nerv bei der Ratte unterhalb der Ohrspeicheldrüse und kann von dieser leicht mobilisiert werden (Mattox und Felix 1987). In der Ohrspeicheldrüse (Glandula parotis) verzweigt er sich in seine peripheren Äste (Abb. 5), die verschiedene Partien der mimischen Muskulatur innervieren (Greene 1935). Der operative Zugang in der retroaurikulären Region ist relativ einfach und ermöglicht eine Durchtrennung des N. facialis ohne wesentliche Interferenz mit der sensorischen Innervation durch den N. trigeminus. Während die Nervengabelung beim Menschen innerhalb der Glandula parotis liegt, teilt sich der Fazialisstamm bei der Ratte circa 6 mm nach seinem Austritt aus dem Foramen stylomastoideum an einer makroskopisch sichtbaren Furkation. Hier erfolgt eine Aufteilung in die beiden Hauptäste, den Ramus zygomaticobuccalis und den Ramus marginalis mandibulae. Des Weiteren teilen sich der Ramus temporalis und der Ramus cervicalis ab. Aufgrund ihrer geringen Größe sind diese Äste jedoch meist anatomisch nicht darstellbar. Distal der Furkation erfolgt die Aufgliederung des Ramus zygomaticobuccalis in seine Endäste (Mattox und Felix 1987).

### **1.3.3 Innervation der mimischen Muskulatur bei der Ratte**

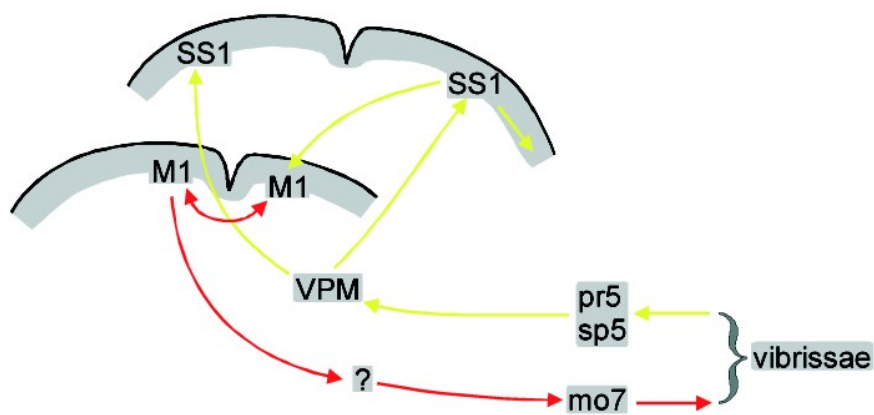
Wie bei allen Säugetieren geht bei der Ratte die willkürliche Steuerung der Motoneurone, die die Muskulatur des Gesichts innervieren, von einem Feld des primär motorischen Kortex (MI) in der

Frontalhirnrinde aus (Fazialisrepräsentation). In den anderen Teilen des MI findet man eine somatotope Repräsentation der Muskulatur des gesamten Körpers („Rattunculus“; Hall und Lindholm 1974) (Abb. 2).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der somatotopischen Repräsentationskarte des primär motorischen Kortex (MI) der Ratte nach Hall und Lindholm (1974, S. 27). Das Repräsentationsfeld der vom N. facialis innervierten Gesichtsmuskulatur befindet sich als anterior-posterior, paramedian verlaufender Streifen im Zentrum von MI (rot unterlegt).

Die motorischen Repräsentationen der verschiedenen Körperregionen sind mit folgenden Abkürzungen bezeichnet: E, EL = Augenerbulbus, Augenlider; HL = hintere Gliedmaße; T = Rumpf; FL = vordere Gliedmaße; V = Vibrissen; R = Nase; J = Kinn; L = Lippen; To = Zunge. (Orientierung: "0" auf der Medianlinie = Bregma)



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der für die Verarbeitung der sensorischen Information aus den Vibrissen sowie für die motorische Innervation der Gesichtsmuskulatur relevanten Hirnregionen. Die Hirnregionen sind mit folgenden Abkürzungen bezeichnet: SSI = Somatosensorischer Kortex; MI = Motorkortex; VPM = Nucleus ventralis posteromedialis thalami; pr5 = Nucleus principalis nervi trigemini; sp5 = Nucleus spinalis nervi trigemini, mo7 = Nucleus facialis; vibrissae = Vibrissen

Vom primären Motorkortex (MI) aus verläuft die neuronale Erregung bei der Ratte über die Axone der Pyramidenneuronen des Tractus corticonuclearis, die sich überwiegend in der Lamina V des Kortex befinden (Zilles und Wree 1995), durch die Capsula interna, durch den Pedunculus cerebri bis zur Brücke (Pons), wo die Mehrheit dieser Axone auf die kontralaterale Seite kreuzt und, soweit sie zur Steuerung der Gesichtsmuskulatur beitragen, im Fazialiskern (Nucleus facialis) enden (Abb. 3). Im Nucleus facialis erfolgt die synaptische Umschaltung auf die Motoneurone, die zusammen mit ihren Axonen und motorischen Endplatten die motorische Endstrecke bilden. Ferner erfolgt an dieser Stelle die konvergente synaptische Verschaltung zahlreicher Informationskanäle. Dazu gehören Informationen aus dem extrapyramidal-motorischen System und sensorische Information aus dem N. Trigeminus (Paxinos 1995). Letztere hat bei der Ratte für bestimmte Reflexe eine wesentliche Bedeutung. So bildet der N. trigeminus beim sogenannten Lidschlussreflex den afferenten Schenkel, während der efferente Teil des Reflexbogens über den N. facialis nach Umschaltung im Nucleus facialis in den Musculus orbicularis oculi läuft.

Innerhalb des MI sind die Muskelsysteme der verschiedenen Körperteile eng benachbart repräsentiert (Abb. 2). Die motorische Repräsentation der Gesichtsmuskulatur (bei der Ratte sind die wichtigsten die Vibrissenmuskeln) befindet sich als anterior-posterior, paramedian verlaufender Streifen im Frontalkortex. Medial wird die Fazialisregion durch die Repräsentation der Muskeln des Augenbulbus und der Augenlider begrenzt. Lateral liegt die Repräsentation der Muskeln der vorderen Gliedmaße. Posterior befinden sich die motorische Repräsentation des Rumpfes und der hinteren Gliedmaße, die sich teilweise mit der des primär somatomotorischen Kortex (SI) überlappen („dysgranuläres Kortexfeld“) (Donoghue und Wise 1982).

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Zur Untersuchung von funktionell-morphologischen Veränderungen im Neokortex nach Läsion des peripheren N. facialis wurden adulte Ratten verwendet. Die standardmäßige Verwendung von Ratten als Versuchstieren in der naturwissenschaftlichen Forschung ist auf dem Hintergrund ihrer guten Verfügbarkeit bei unkomplizierten Zucht- und Haltungsbedingungen zu verstehen. So werden zahlreiche Untersuchungen über zentralnervöse Veränderungen nach peripheren Nervenläsionen und die hierdurch ausgelösten, plastischen Prozesse im ZNS an dieser Säugetierspezies durchgeführt. Nach Läsion des N. facialis wurden zur Darstellung der morphologischen Veränderungen in Neokortex und Hirnstamm Untersuchungen auf lichtmikroskopischer als auch elektronenmikroskopischer Ebene angestellt.

### 2.1 Zielproteine

Zur Darstellung der auf die periphere Nervenläsion erfolgende Reaktion von Neuronen und/oder Astroglia wurden Neuroligin 1, Synaptophysin und S 100-Proteine als immunhistochemische Marker verwendet. Zur Quantifizierung der morphologischen Veränderungen wurden sowohl die räumlichen Verteilungsmuster der Immunreaktivität der verschiedenen Antikörper untersucht, als auch ihre Intensitätsunterschiede beurteilt.

Das synaptische Vesikelprotein Synaptophysin (Syn) wurde als präsynaptischer, das Synapsenadhäsionsmolekül Neuroligin 1 (NL1) als postsynaptischen Marker genutzt. Synaptophysin ist ein ubiquitär vorkommendes, synaptisches Vesikelprotein. Es besitzt vier jeweils 38 kDa schwere Transmembrandomänen, befindet sich in neuroendokrinen Zellen sowie in nahezu allen Neurons des Gehirns und Rückenmark, in denen synaptische Transmission stattfindet. Sein allgegenwärtiges Auftreten an der Synapse hat dazu geführt, dass die Synaptophysin-Immunfärbung für die Quantifizierung von Synapsen verwandt wird (Calhoun et al. 1996). Jüngste Arbeiten lieferten Hinweise dafür, dass Synaptophysin eine Rolle bei der Regulierung aktivitätsabhängiger Synapsenbildung spielt (Tarsa und Goda 2002). Die exakte Funktion des Proteins ist unbekannt. Experimente zeigten, dass Tiere, in welchen das Synaptophysin inaktiviert war, sich normal entwickelten und funktionieren (McMahon et al. 1996). In Anlehnung an Arbeiten zu verwandten Fragestellungen wurde das S100-Protein (S100) als Gliamarker genutzt (Landgrebe et al. 2000, Laskawi et al. 1997).



## **2.2 Experimentalbedingungen**

### **2.2.1 Versuchstiere und Narkose**

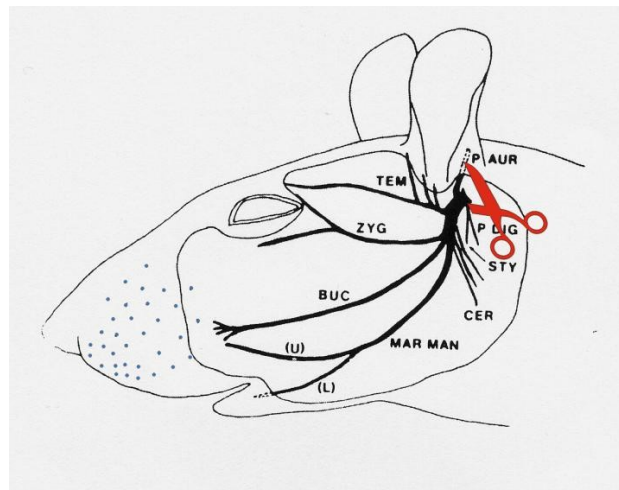
Als Versuchstiere wurden Ratten des Sprague-Dawley-Stammes (*Rattus norvegicus*; CD, Fa. Charles River) benutzt. Als Futter erhielten sie Rattendiät (Pellets, Fa. Sniff) und Leitungswasser, beides ad libitum während eines künstlichen 12-stündigen Tag/Nacht Zyklus. Die Operationen wurden an insgesamt 35 adulten, mit Ketavet® (50 mg/kg KG) und Rompun® (4 mg/kg KG) narkotisierten Tieren (250-350 g) durchgeführt.

### **2.2.2 Operativer Zugang und Läsion**

Die Region des knorpeligen Gehörganges wurde durch einen retroaurikulären Schnitt freigelegt. Am Vorderrand des Musculus trapezius ließ sich nach Präparation der Stamm des Nervus facialis darstellen. Bei den Läsionsexperimenten wurde stets der rechte Nervus facialis exponiert und mittels einer Schere durchtrennt, wobei der Nervus auricularis posterior als einziger Ast erhalten wurde. Nach der Nervendurchtrennung wurde zur Kontrolle der Funktionsverlust mit einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung auf das geöffnete rechte Auge überprüft: Nach Ausfall des ipsilateralen Nervus facialis fehlt der Blinkreflex dieses Auges. Anschließend wurde die Wunde vernäht. Den Operationssitus, sowie Lage und Verzweigung des Nervus facialis auf der rechten Gesichtshälfte der Ratte sind in Abbildung 4 und 5 dargestellt. Die Überlebenszeiten betragen 4 Stunden, 1 Tag, 3 Tage, 5 Tage und 10 Tage.



**Abb. 4:** Darstellung des N. facialis für die Läsionsoperation. Der dicke Pfeil weist auf den Stammbereich, der kleine Pfeil auf den zum Ohr hin aufsteigenden Ast des Nervus auricularis posterior. Die nicht gefüllten Pfeile weisen auf die Gabelung des Nervus facialis (Vergrößerung x 7,5).



**Abb. 5:** Schema zur Verzweigung des Nervus facialis im lateralen Bereich des Rattenkopfes. Die Schere deutet auf den Abschnitt, wo die Durchtrennung erfolgte. Bei allen Tieren wurde der Eingriff am rechten Nerv durchgeführt (Schema modifiziert nach Semba und Egger, 1986)

## 2.3 Präparation des Gewebes

Zur lichtmikroskopischen Darstellung der Verteilung von Neuroligin 1 (NL1), Synaptophysin (Syn) und S100b (S100) wurden die Tiere zu den verschiedenen Überlebenszeiten in tiefer Äthernarkose kardial perfundiert. Um das Gefäßsystem zunächst von Blut zu befreien, wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer (PB), (pH 7,4) vorperfundiert, bis die exponierten Venae jugulares kein Blut mehr enthielten. Anschließend erfolgte langsam (circa 10 Minuten) bei einem hydrostatischen Druck von 100 cm Wassersäule die Perfusion mit der Fixierlösung (4% Paraformaldehyd und 0,5% Glutaraldehyd in 0,1 M PB (pH 7,4), siehe Rickmann und Wolff (1995 b). Die Gehirne wurden entnommen und für 2 – 3 Stunden in demselben Fixativ nachfixiert. Anschließend wurden sie über Nacht in eine 20%ige Saccharoselösung überführt, um beim Gefrierschneiden die Bildung von Gefrierartefakten zu vermeiden. Mit einem Gefriermikrotom (Frigocut®, Fa. Jung) wurden am Folgetag 40 µm dünne, koronar orientierte Seriengefrierschnitte angefertigt. Diese wurden für die immunohistochemische Weiterbehandlung im so genannten free-floating-Verfahren, d.h. nicht an Objektträger gebunden, weiterverarbeitet. In insgesamt 18 operierten Tieren wurde der Nucleus facialis untersucht und mit dem entsprechenden Kern von 3 Kontrolltieren verglichen. In 14 operierten Tieren wurde das Fazialisrepräsentationsgebiet im Motorkortex analysiert und mit dem von 4 Kontrolltieren verglichen.

## 2.4 Immunhistochemische Darstellung der untersuchten Proteine

Um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren, wurden die Schnitte dann 24 Stunden lang in einer Blocklösung (3% Ziegen Serum und 0,1 M Lysin in TBS) aufbewahrt.

### 2.4.1 Immunohistochemie

Da der Antigen-Antikörperkomplex mit der Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Methode sichtbar gemacht werden sollte, wurden die Hirnschnitte in einer Lösung von 10% Methanol und 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,1 M Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (TBS, pH 7,4) für 20 Minuten inkubiert, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu blockieren. Danach wurden sie in eine Blocklösung überführt um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Die Blocklösung stammte aus der Tierart, aus der der 2. Antikörper („Brückenantikörper“) gewonnen worden war. Diese „Blocklösung“ enthielt 3% NGS („normal goat serum“ = normales Ziegen Serum) und 0,1 M Lysin

in 0,1 M TBS (pH 7,4). Die Inkubation erfolgte wiederum über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in einer Blocklösung, die über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert wurde. Gegen S100-Proteine wurden polyklonale Antikörper (Dako Diagnostics, Verdünnung 1:2000) verwendet. Monoklonale Antikörper gegen Neuroligin 1 wurden von Nils Brose zur Verfügung gestellt (Song et al. 1999) und 1:500 bis 1:1000 verdünnt. Monoklonale Antikörper gegen Synaptophysin (Dako Diagnostics, Clone SY38) wurden 1:500 verdünnt. Nach dreimaligem 30-minütigem Waschen in TBS wurde mit dem Brückenantikörper (1:50 in Blocklösung, Ziege anti Kaninchen oder Ziege anti Maus verdünnt, Fa. Nordic) für 1,5 Stunden inkubiert. Wiederum wurde dreimal 30 min lang in TBS gewaschen. Danach wurde mit dem PAP-Komplex (Kaninchen anti Peroxidase oder Maus anti Peroxidase, Fa. Nordic) bei Verdünnung 1 : 400 in Blockserum für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde viermal in TBS (pH 7,4) gewaschen.

Zum Nachweis der Peroxidase nach Adams (1981) wurden die Schitte in Tbs gewaschen und in eine Lösung aus 0,05% Diaminobenzidin (DAB), 0,025% Kobaltchlorid, 0,02% Nickel-Ammoniumsulfat und 0,001% Sauerstoffperoxid in 0,1 M Tbs (pH 7,4) überführt und für 15 Minuten inkubiert. Die Schnitte wurden daraufhin in 0,5%iger Gelatine (in 40% Ethanol) aufgezogen, getrocknet und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 100% und 2x Xylol je 10 Minuten) entwässert. Zum Abschluss wurden sie mit Entellan (Fa. Merck) eingedeckt.

## **2.5 Quantifizierung der Kortexareale mit erhöhter Immunreaktivität**

Um die in verschiedenen Kortexregionen erhöhte Immunreaktivität quantifizieren zu können, wurden Bilder der einzelnen Hirnschnitte angefertigt. Mit diesen Bildern wurden kortikale "Aufsichtskarten" hergestellt, in denen die Immunfärbungen der jeweiligen Antikörper über größere Kortexareale hin dargestellt werden konnten. Hierbei repräsentierte jeder fünfte der 40 µm dicken Hirnschnitte einen circa 200 µm langen Abschnitt der anterior-posterioren Hirnachse.

Bei der Auswahl der Hirnschnitte für die Bildbearbeitung erfolgte zunächst ein Ausschluss von Färbeartefakten. Färbeartefakte der einzelnen Schnitte wurden ausgeschlossen, indem überprüft wurde, ob der jeweils mit dem gleichen Antikörper angefärbte nächste Schnitt das gleiche, bzw. ein fast gleiches Färbemuster erkennen ließ. Im Folgenden wurden alle Schnitte ausgewertet, auf denen keine Färbeartefakte vorhanden waren.

## 2.6 Scanvorgang

Die auf Objektträger aufgezogenen, histologischen Hirnschnitte wurden einzeln digital eingescannt. Hierfür wurde ein Agfa Vision 35 Dia Scanner benutzt. Die Scanner-Software war Foto Look Version 1.2 PS.

Um Streulicht während des Scanvorgangs zu vermeiden, wurde ein Rahmen aus schwarzem Karton angefertigt und um die Schnitte platziert, dessen Fenster geringfügig größer als die Schnitte war. Die Objektträger mit den Schnitten wurden sorgfältig in die Halterung des Standard-Dialhalter eingelegt und anschließend wurde ein normaler Scanvorgang für Dias gestartet.

Für den Vorgang wurden folgende Vorlagen aus dem Scan-Dialog des Interfaces gewählt: Modus: Graustufen, Original: Transparent, Input: 300 ppi, Scale to: 1000 %, Dichte: Weiß-/Schwarzpunkt, Tonkurve: Keine, Schärfe: Keine, Fokus: Automatik, Vorgaben: Allgemein, Einstellungen: Aktuell.

Das Schwarzpunktwerkzeug wurde benutzt, indem der dunkelsten Stelle auf dem Schnittbild-Vorscan der Wert 95 gegeben wurde. So wurde mit jedem eingescannten Schnittbild verfahren. Nach diesem Schritt wurde der Scan-Vorgang gestartet. Das eingescannte Bild wurde im tiff-Format in einem ausgewählten Order gespeichert.

Anschließend wurden die Dateien mit dem jeweiligen Schnittbild einzeln mit dem Programm Adobe Photoshop Version 5 geöffnet. Der Bereich um das jeweilige Hirnbild wurde ausgewählt und gelöscht, wodurch dieser Bereich transparent wurde. Hierdurch wurde es möglich, verschiedene Bilder zusammen in einer neuen Bilddatei zu bringen. Dabei wurde jedem Bild eine eigene Ebene zugeteilt. Die solchermaßen jeweils auf verschiedenen Ebenen existierenden Bilder konnten nun so überlappend hintereinander angeordnet werden, so dass nur das erste Bild ganz sichtbar war. Von den dahinter angeordneten Bildern war nur der für die Auswertung relevante Hirnteil, vor allem der Neokortex, sichtbar. Resultat war eine Bildserie von Hirnschnitten, welche eine Evaluierung der Färbereaktion erlaubte.

## **2.7 Elektronenmikroskopie**

### **2.7.1 Konventionelle Elektronenmikroskopie**

Tiere, die für die Transmissions-Elektronenmikroskopie vorgesehen waren, wurden nach Vorperfusion (s.o.) über einen Zeitraum von circa 10 Minuten transkardial mit einer Fixierlösung perfundiert, die 3% Glutaraldehyd und 3% Paraformaldehyd in 0,1 M PB (pH 7,4) enthielt. Die Gehirne wurden entnommen und über Nacht in demselben Fixativ belassen. Anschließend wurden circa 1 mm dicke koronare Kortexscheiben angefertigt und diese 2 x 10 Minuten in 0,1 M PB (pH 7,4) gewaschen. Die Gewebescheiben wurden in 1% OsO<sub>4</sub> in 0,1 M PB (pH 7,4) für 2 Stunden nachfixiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurden die Scheiben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30% und 50% für je 5 Minuten, 70%, 90%, 100% für je 30 Minuten) und Propylenoxid (2 x 10 Minuten) entwässert und nach Standardprotokoll in Epon 812 eingebettet. 2 µm dicke Semidünnschnitte dienten der genauen Bestimmung der Kortexregion, von welcher dann Ultradünnschnitte (30 – 60 nm) am Ultracut (Fa. Reichert) angefertigt wurden. Die Ultradünnschnitte wurden auf Formvar-beschichtete Kupferblenden (Fa. Veco) aufgenommen und mit Uranylacetat (15 – 20 Minuten) und Bleicitrat (7 Minuten) nach Reynolds (1963) kontrastiert. Am Elektronenmikroskop (EM 10, Fa. Zeiss) wurden Aufnahmen mit Scientia Filmen (Fa. Agfa Gevaert) angefertigt.

### **2.7.2 S100 "pre-embedding" elektronenmikroskopische Immunzytochemie**

Für die elektronenmikroskopische Darstellung der S100-Proteine erfolgten Perfusionsfixierung und immunhistochemische Reaktion wie für die Lichtmikroskopie beschrieben. Zur besseren Gewebserhaltung im Elektronenmikroskop wurden jedoch anstelle der Gefrierschnitte 70 µm dicke Vibratomschnitte angefertigt. Diese wurden nach erfolgter immunhistochemischer Reaktion (s.o.) und Entwässerung (s.o.) in Spurr's Epoxymedium (Fa. Serva) nach Standardprotokoll eingebettet. Zur Polymerisation wurden die Schnitte auf mit Overheadfolie beschichtete Glasobjektträger aufgezogen, um eine möglichst ebene Flacheinbettung der Schnitte zu gewährleisten. Danach wurden die eingebetteten Schnitte auf Epon-Blöcke geklebt. Durch zweimaliges Schneiden (erst

semidünn, dann ultradünn) wurden Ultradünnschnitte angefertigt, in denen Strukturhaltung und Eindringtiefe der Antikörper optimal waren.

## 2.8 Western Blot

Die Spezifität des Neurologin 1 - Antikörpers wurde anhand eines Western Blots überprüft.

### 2.8.1 SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen nach Laemmli (1970)

Durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden (Laemmli 1970). Das für die Denaturierung verwendete SDS ist in der Lage, Polypeptidketten aufzufalten und diese dann einheitlich mit einer negativen Ladung (ca. ein SDS-Molekül pro drei Peptidreste) zu beladen. Aufgrund des konstanten Verhältnisses von Gewicht und Ladung erfolgt die Auftrennung der Proteine durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamidgels nach der Größe der Proteine. Durch die Verwendung von Dithiotreitol werden vorhandene Disulfidbrücken reduziert. Eine optimale Proteinauftrennung erreicht man durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE, bei der das Gel in Trenn- und Sammelgel unterteilt wird. Für die in dieser Arbeit verwendeten Proteingele wurden 7,5 – 15 %ige Trenn- und 3,5 %ige Sammelgele gegossen.

#### Material:

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4 %SDS.

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4 %SDS.

AMBA: 30 % Acrylamid/N,N'-Methylen-bis-Acrylamid lösung 37,5:1.

10 % APS: 10 % Ammoniumpersulfat in dest. H<sub>2</sub>O.

Wassergesättigtes 1-Butanol.

Laufpuffer: 3 g Tris Base, 14,4 g Glycin, 2 g SDS, H<sub>2</sub>O dest. ad 1 Liter, pH 8,8

3 x Propenpuffer: 45 g SDS, 124,8 ml Sammelgelpuffer, 15 ml 0,1 M EDTA, 150 g Saccharose, 0,2 % Bromphenolblau, dest. H<sub>2</sub>O ad 450 ml, 50 ml 1,5 M Dithiotreitol.

Marker für 7,5 %ige Trenngele: Bio-Rad *Prestained SDS-Page Standards, High Range*: 213 kDa, 119 kDa, 83 kDa, 47 kDa.

Marker für 10 - 15 %ige Trenngele: Bio-Rad *Prestained SDS-Page Standards, Low Range*: 111 kDa, 77 kDa, 48 kDa, 34 kDa, 34 kDa, 29 kDa, 21 kDa.

#### Methode:

Die Komponenten des Trenngels (Tab. 1) werden gemischt und in die wie vom Hersteller beschrieben zusammengebaute Gießapparatur mit gründlich gereinigten Glasplatten gegossen.

	12%- Trenngele:	7%- Trenngele:	Sammelgel
H <sub>2</sub> O dest.:	1,75 ml	2,5 ml	1,25 ml
AMBA:	2 ml	1,25 ml	250 µl
Puffer:	1,25 ml	1,25 ml	500 µl
Temed:	7 µl	7 µl	5 µl
10% APS:	12 µl	12 µl	12 µl

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der Gellösungen

Um eine glatte Grenzfläche zwischen Trenn- und Sammelgel zu erzielen, wird das Trenngel nach dem Gießen mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nachdem das Trenngel vollständig polymerisiert ist, wird das Butanol mit Wasser vom Gel gespült und die Kammer vorsichtig mit dem Filterpapier getrocknet. Dann werden die Komponenten des Sammelgels (Tab. 1) gemischt und auf das Trenngel gegossen. Um den Platz für das Laden der Proben freizuhalten, wird vorsichtig ein Kamm zwischen die Glasplatten geführt. Das fertige Gel wird in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Die Proben in 1 x Probenpuffer und der Molekulargewichtsstandard werden auf das Gel geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei konstanter Stromstärke (20 mA pro Gel).

### **2.8.2 Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen**

Um die auf dem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, müssen sie angefärbt werden. In der vorliegenden Arbeit wird dies mit zwei verschiedenen Methoden erreicht, die unterschiedlich empfindlich sind. Die Coomassiefärbung erlaubt die Detektion von 0,3-1 µg Protein je Bande, mit Hilfe der Silberfärbung lassen sich noch 1-10 ng Protein/Bande nachweisen.



### 2.8.3 I Coomassie – Färbung (modifiziert nach Weber und Osborn, 1969)

#### Material:

Färbelösung: 0,15 % Coomassie Brillant Blue R250, 10 % Eisessig, 25 % Isopropanol in H<sub>2</sub>O dest., filtriert.

Entfärbelösung: 30 % Methanol, 10 % Eisessig in H<sub>2</sub>O dest., filtriert.

#### Methode:

Das Gel wird 10-30 min bei Raumtemperatur in der Färbelösung inkubiert und anschließend in der Entfärbelösung bis zur vollständigen Reduktion des Hintergrundes entfärbt. Alternativ dazu kann das Gel auch durch zweimaliges Kochen in Wasser für je 10 min entfärbt werden.

### 2.8.4 Transfer von Proteinen auf Nitrosezellulose (Towbin et al. 1992)

#### Material:

Blotpuffer: 3 g Tris Base, 14,4 g Glycin, H<sub>2</sub>O ad 800 ml, 200 ml Methanol.

Ponceau S -Färbelösung: 0,1 % (w/v) Ponceau S, 5 % Eisessig, filtriert.

#### Methode:

Die Proben werden zunächst einer SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese unterzogen, das Sammelgel wird abgeschnitten. Das Trenngel wird in einem Bad mit Blotpuffer luftblasenfrei auf eine auf zwei Filterpapieren liegende Nitrozellulosemembran gelegt. Auf das Gel werden wiederum zwei Filterpapiere gelegt, und dieser Stapel wird in eine mit Blotpuffer gefüllte Blotkammer eingespannt. Der Transfer der Proteine erfolgt bei 30 mA und 4 °C über Nacht oder bei 250 mA, 4°C für 2 Stunden. Um die Vollständigkeit des Transfers zu überprüfen, wird die Membran durch kurzes Schwenken in Ponceau-S-Lösung angefärbt. Die Färbung läßt sich mit Hilfe von PBS vollständig entfernen.

### 2.8.5 Immundetektion von Proteinen durch „Enhanced Chemiluminescence (ECL)“

Die Immundetektion von Proteinen erfolgt durch den Einsatz eines für das Protein spezifischen mono- oder polyklonalen Antikörpers („primärer Antikörper“). Dieser wird von einem gegen ihn gerichteten sekundären Antikörper (Ziege gegen Maus bzw. Ziege gegen Kaninchen) detektiert, an den die Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Die Peroxidase spaltet Wasserstoffperoxid und das entstehende Peroxid ( $O_2^{2-}$ ) oxidiert Luminol unter Abspaltung von Stickstoff bei alkalischen Bedingungen. Dabei emittiert Luminol am Ort der Antikörperbindung Licht einer Wellenlänge von 428 nm („Chemilumineszenz“), das durch „Enhancer“ verstärkt wird und auf einem speziellen für Blaulicht sensitiven Röntgenfilm detektiert wird.

#### Material:

Puffer A: 5 % Ziegen Serum, 5 % Trockenmilch, 1x TBS, 0,1 % Twen 20.

Puffer B: 1x TBS, 0,1 % Twen 20.

#### Methode:

Um die unspezifischen Reste der auf Nitrozellulosemembran transferierten Proteine abzusättigen, wird die Membran für 30 min in Puffer A inkubiert. Nach Zugabe des primären Antikörpers und einstündiger Inkubation wird die Membran fünfmal für jeweils fünf Minuten mit Puffer A gewaschen. Der sekundäre Antikörper wird ebenfalls für eine Stunde in Puffer A auf der Membran inkubiert und anschließend viermal mit Puffer A, und je einmal mit Puffer B und TBS für je fünf Minuten gewaschen. Die beiden Komponenten des ECL-Systems werden 1:1 gemischt, auf die auf einer Glasplatte liegenden Nitrozellulose pipettiert und für eine Minute inkubiert. Die überflüssige Lösung wird um die Membran herum mit einem Filterpapier abgesaugt und der Blot auf einem Röntgenfilm in ansteigenden Zeitabständen exponiert (5 sec, 15 sec, 30 sec, 1 min, 5 min, 10 min und eine längere Exposition, um die Ränder zu erkennen und die Markerpositionen zu übertragen).

### **3 ERGEBNISSE**

Insgesamt wurden 35 Tiere verwendet. Davon wurden bei 21 Tieren der die Kerngebiete des Nervus facialis und des Nervus trigeminus enthaltende Hirnstamm und bei 14 Tieren der Neokortex untersucht (bei einigen Tieren wurden sowohl der Hirnstamm als auch der Neokortex untersucht).

#### **3.1 Lichtmikroskopische Verteilung der Immunreaktivität von Neuroligin 1, Synaptophysin und S100 im Nucleus facialis**

Im Nucleus facialis entspringt die überwiegende Zahl der Motoneurone, die den Nervus facialis bilden, und die bei dessen experimenteller Durchtrennung für diese Arbeit axotomiert wurden. Der Nucleus spinalis nervi trigemini, einer der drei sensiblen Kerne des Nervus trigeminus., wurde ebenfalls untersucht, weil der sensorische Input der motorisch gelähmten Vibrissen zuerst in diesem Kern verschaltet wird.

Um morphologische Veränderungen in diesen beiden Hirnnervenkernen nach Fazialisläsion zu zeigen, sollten in dieser Arbeit die Immunreaktionen von Neuroligin 1 (NL1), Synaptophysin (Syn) und S100-Protein (S100) zu verschiedenen Überlebenszeiten nach Fazialisaxotomie gezeigt werden. Hierbei sollte Neuroligin 1 als postsynaptischer Marker Rückschlüsse auf die Synapsenadhäsion geben. Synaptophysin als Vesikelmolekül diene als präsynaptischer Marker. Da in vorangehenden Arbeiten gezeigt wurde, dass Astrozyten ebenfalls auf die Veränderung neuronaler Aktivität reagieren, wurde der Marker S100 mit verwendet, welcher Astrozyten bis in die feinsten Lamellen anfärbt.

##### **3.1.1 Verteilung der untersuchten Proteine im Nucleus facialis von Kontrolltieren**

In normalen, unbehandelten Tieren war feststellbar, dass der Nucleus nervi facialis bei allen drei verwendeten Antikörperfärbungen eine hohe Immunreaktivität im Vergleich zu den angrenzenden

Hirnstammgebieten besitzt (Abb. 6). Dieses Markierungsmuster war seitengleich. Auch der Nervus spinalis nervi trigemini weist eine höhere Immunreaktivität gegenüber den medial angrenzenden Hirnstammstrukturen (Formatio reticularis) auf. Im Seitenvergleich fand sich in allen Kontrolltieren eine gleiche Färbeintensität in den Nuclei der Fazialis- und der Trigeminierven.

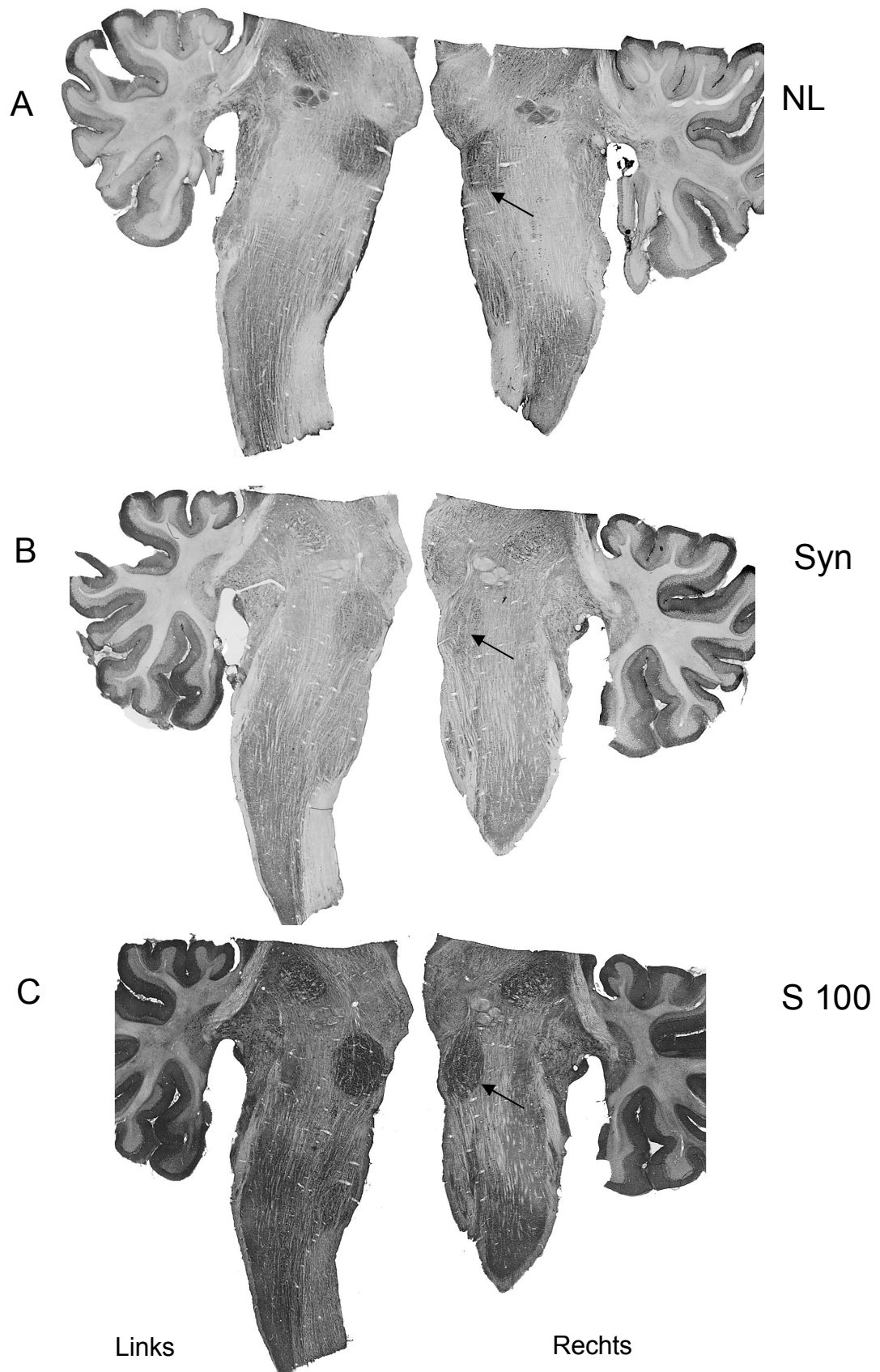
Die Lokalisation von Neuroligin 1 (NL1) war in beiden Kerngebieten überwiegend in den Somata und proximalen Dendriten der großen Neurone zu finden. S 100-Protein (S100) war neuronal und astrozytär lokalisiert, Synaptophysin (Syn) fand sich in den den Präsynapsen entsprechenden Punkten.

Da sich die hergestellten Immunfärbungen nicht für eine quantitative Auswertung eignen, wurden Veränderungen des oben beschriebenen Musters semiquantitativ im Seitenvergleich und im Vergleich zu den medialen Bereichen des Hirnstamms ausgewertet. Wichtig war dabei, dass eine Veränderung in mindestens drei aufeinander folgenden Serienschnitten sichtbar sein musste, um Variabilitäten der Immunfärbung auszuschließen.

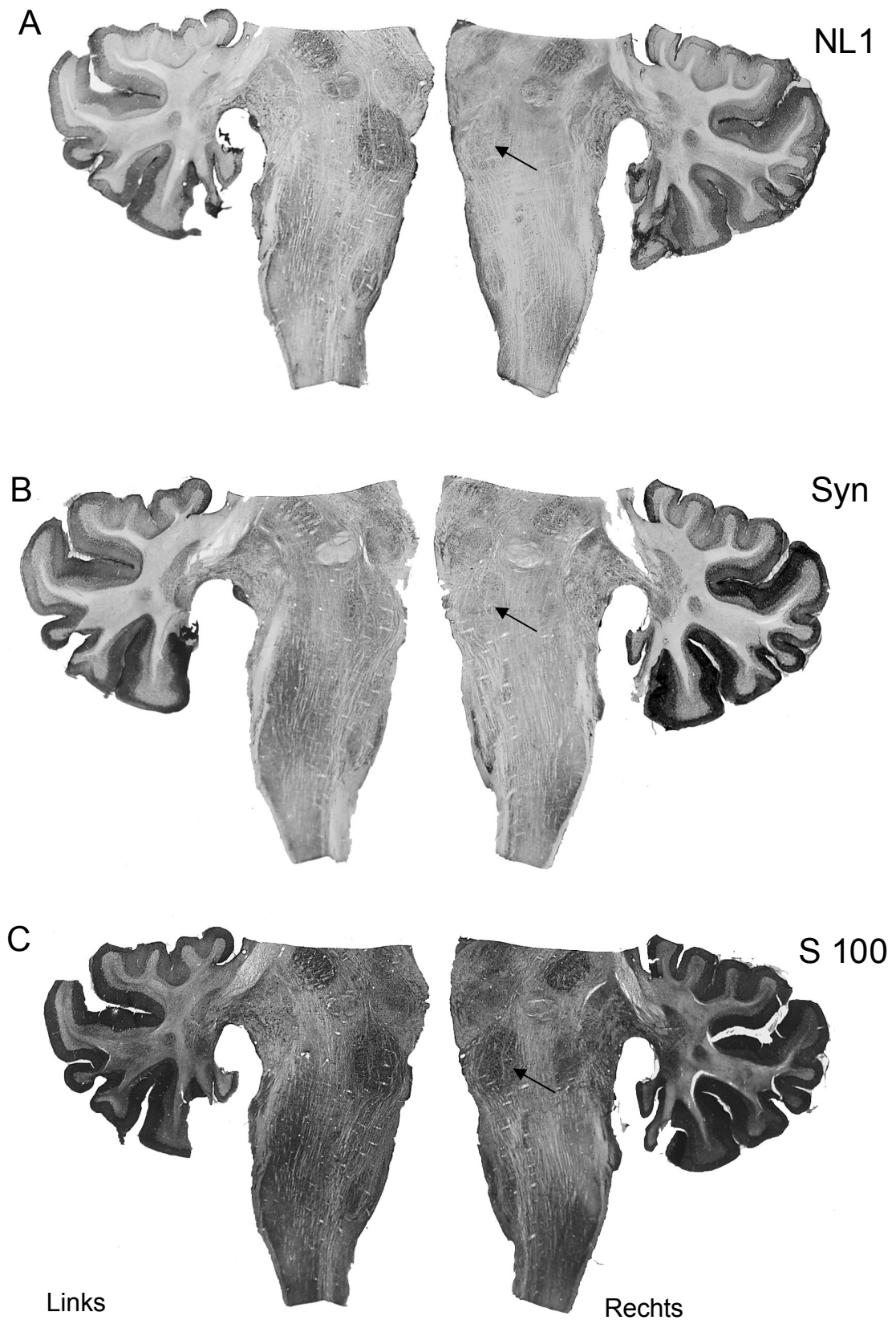
### **3.1.2 Lichtmikroskopische Verteilung der untersuchten Proteine im Nucleus facialis nach Fazialisaxotomie**

1 Tag nach Läsion des Nervus facialis fand sich kein Unterschied der Immunfärbung im Vergleich mit dem Kontrolltier. 3 Tage nach Läsion des Nervus facialis fand sich ebenfalls kein Unterschied der Immunfärbung im Vergleich mit dem Kontrolltier. 5 Tage nach Läsion des Nervus facialis fand sich ein deutlicher Seitenunterschied in der Immunfärbung mit NL1 und Syn im Sinne einer verminderten Immunreaktion im rechten Nucleus facialis (Abb. 6 A und B). Die Anfärbung mit S100 zeigte keinen Seitenunterschied (Abb. 6 C).

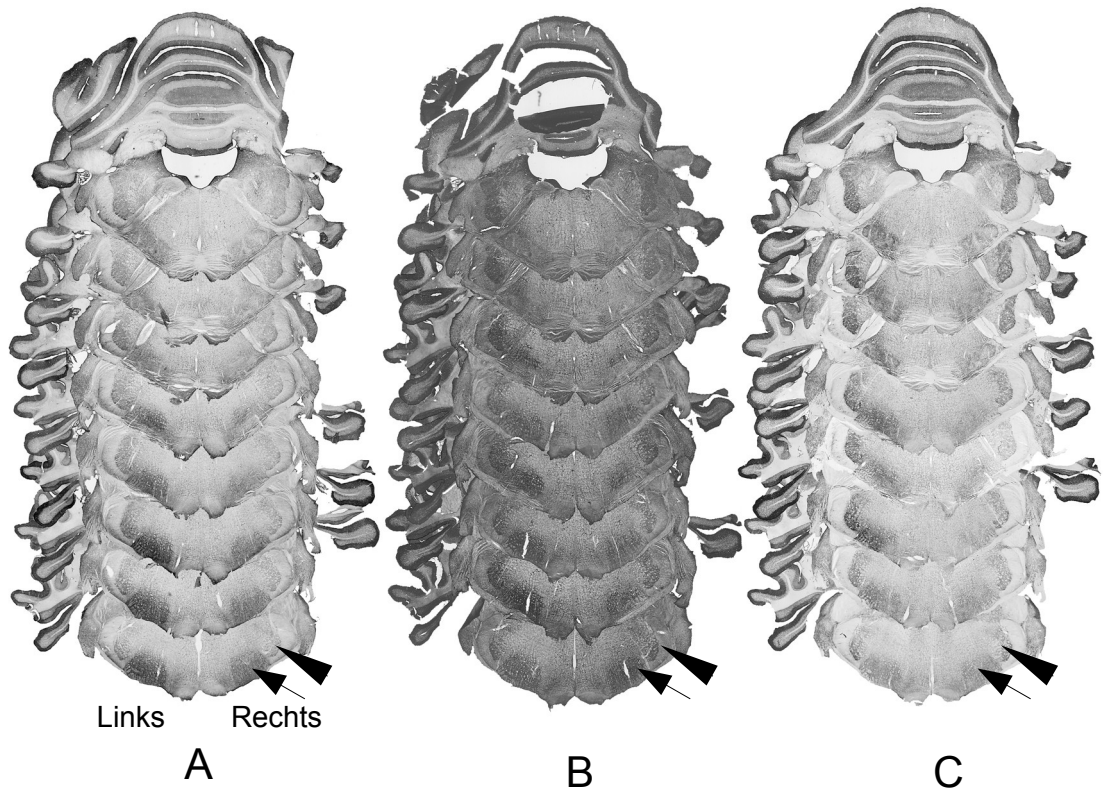
Da der Nucleus spinalis nervi trigemini in den Sagittalschnitten nicht sicher lokalisierbar war, wurden bei einigen Tieren Transversalschnitte angefertigt. Hier ist 5 Tage nach Läsion des Nervus facialis erkennbar, dass zusätzlich zur verminderten Anfärbung des rechten Nucleus facialis auch die Anfärbung des rechten Nucleus spinalis nervi trigemini gegenüber der Gegenseite vermindert war (Abb. 7, 8 und 9). 10 Tage nach Läsion des Nervus facialis fand sich nach wie vor ein deutlicher Seitenunterschied in der Immunfärbung der Nuclei faciales und spinales nervi trigemini (Abb. 10 und 11).



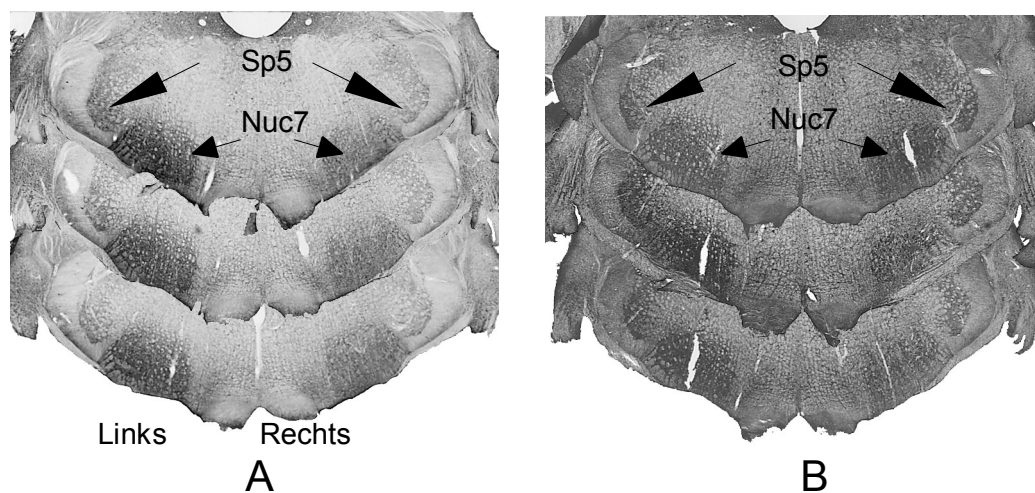
**Abb. 6:** Sagittalschnitte durch den Hirnstamm eines unbehandelten Kontrolltieres (A) mit NL1-Immunreaktivität, (B) mit Synaptophysin-Immunreaktivität und (C) mit S100-Immunreaktivität. Der Pfeil weist jeweils auf den rechten Nucleus facialis.



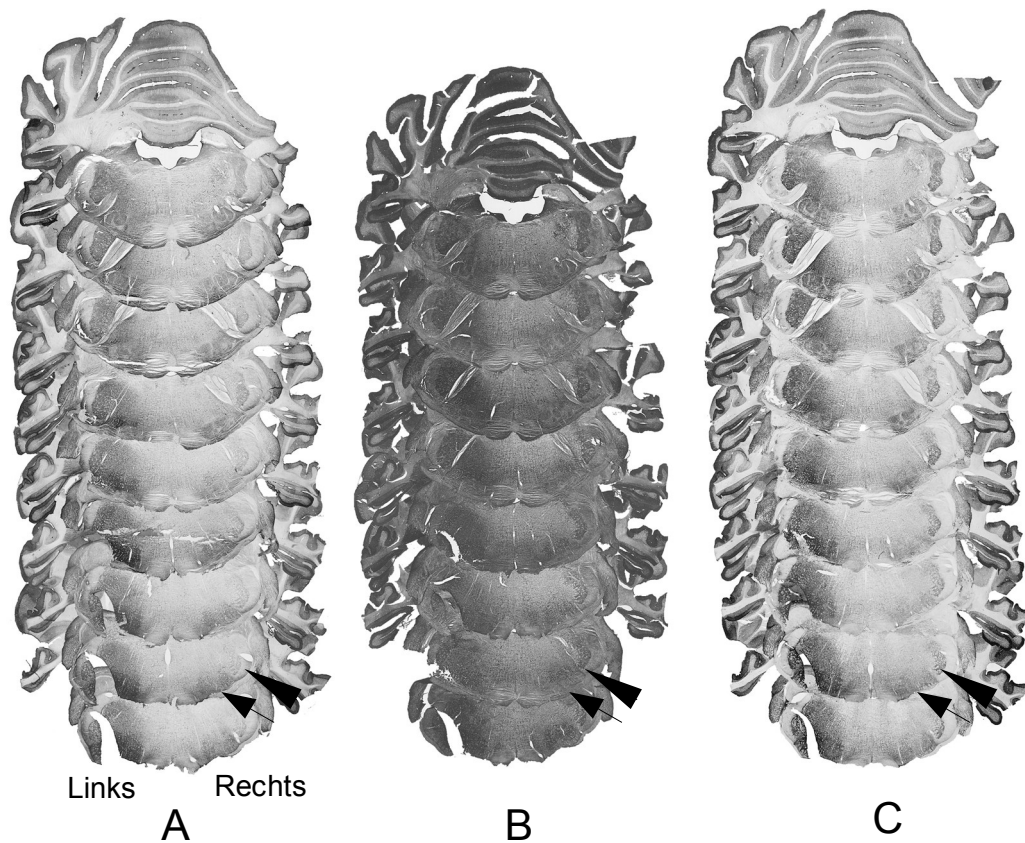
**Abb. 7:** Sagittalschnitte durch den Hirnstamm eines Versuchstieres 5 Tage post-OP (A) mit NL1-Immunreaktivität, (B) mit Synaptophysin-Immunreaktivität (C) mit S100-Immunreaktivität. Der Pfeil weist jeweils auf den rechten Nucleus facialis.



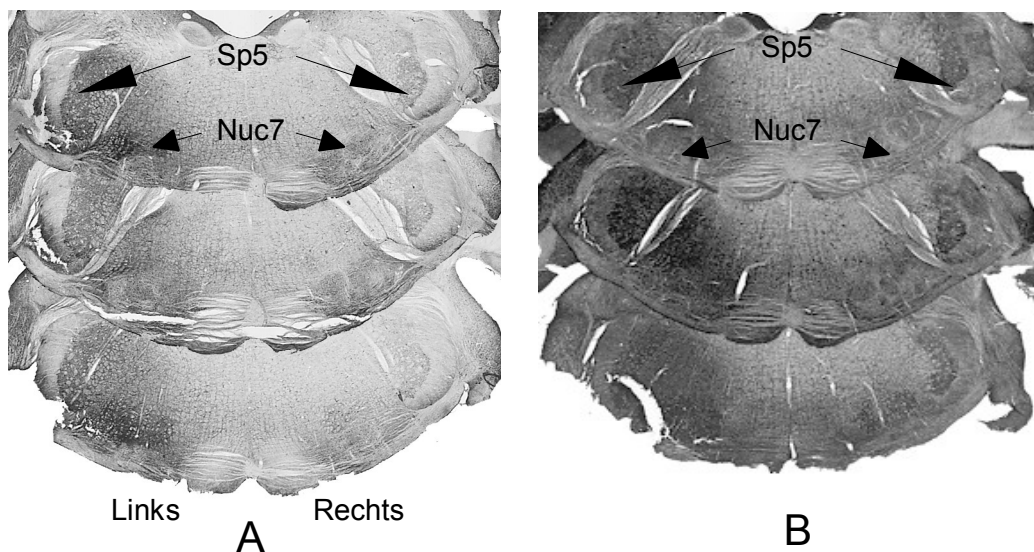
**Abb. 8:** Transversalschnitte durch den Hirnstamm eines fazialisläsionierten Tieres 5 Tage postoperativ. (A) Neuroigin-Immunreaktivität (NL-IR), (B) S100-IR und (C) Synaptophysin-Immunreaktivität (Syn-IR). Der kleine Pfeil weist jeweils auf den rechten Nucleus facialis, der große Pfeil auf den Nucleus spinalis nervi trigemini.



**Abb. 9:** Vergrößerung von ABB. 4 A und B. Der kleine Pfeil weist jeweils auf den rechten und linken Nucleus facialis (Nuc7), der große Pfeil auf den rechten und linken Nucleus spinalis nervi trigemini (Sp5).



**Abb. 10:** Transversalschnitte durch den Hirnstamm eines fazialisläsionierten Tieres 10 Tage postoperativ. (A) Neurologin-Immunreaktivität (NL-IR), (B) S100-IR und (C) Synaptophysin-Immunreaktivität (Syn-IR). Der kleine Pfeil weist jeweils auf den rechten Nucleus facialis, der große Pfeil auf den Nucleus spinalis nervi trigemini.



**Abb. 11:** Vergrößerung von ABB. 5 A und B. Der kleine Pfeil weist jeweils auf den rechten und linken Nucleus facialis (Nuc7), der große Pfeil auf den rechten und linken Nucleus spinalis nervi trigemini (Sp5).



	Nuc7 R	Nuc7 L	Sp5 R	Sp5 L
<b>K</b>				
La 61	~	~	~	~
La 64	~	~	~	~
La72	~	~	~	~
<b>1 Tag</b>				
La 60	~	~	~	~
La 48	~	~	~	~
La 77	~	~	~	~
<b>3 Tage</b>				
La 67	~	~	~	~
La 73	~	~	~	~
La 75	~	~	~	~
<b>5 Tage</b>				
La 49	↓↓	~	↓↓	~
5 T	↓↓	~	↓↓	~
La 57	↓↓	~	↓↓	~
La 66	↓↓	~	↓↓	~
La 68	↓↓	~	↓↓	~
La 70	↓↓	~	↓↓	~
La 71	↓↓	~	↓↓	~
La 76	↓↓	~	↓↓	~
<b>10 Tage</b>				
La 50	↓↓	~	↓↓	~
La 57	↓↓	~	↓↓	~
La 58	↓↓	~	↓↓	~
La 69	↓↓	~	↓↓	~

**Tabelle 2:** Änderung der Immunreaktivitäten von NL1 und Synaptophysin im Nucleus nervi facialis (Nuc7) und im Nucleus spinalis nervi trigemini (Sp5) nach rechtsseitiger Fazialisläsion. R = Rechts, L = Links, ~ = unauffällige IR, ↓ = leicht erniedrigte IR, ↓↓ = stark erniedrigte IR, ↑ = leicht erhöhte IR, ↑↑ = stark erhöhte IR

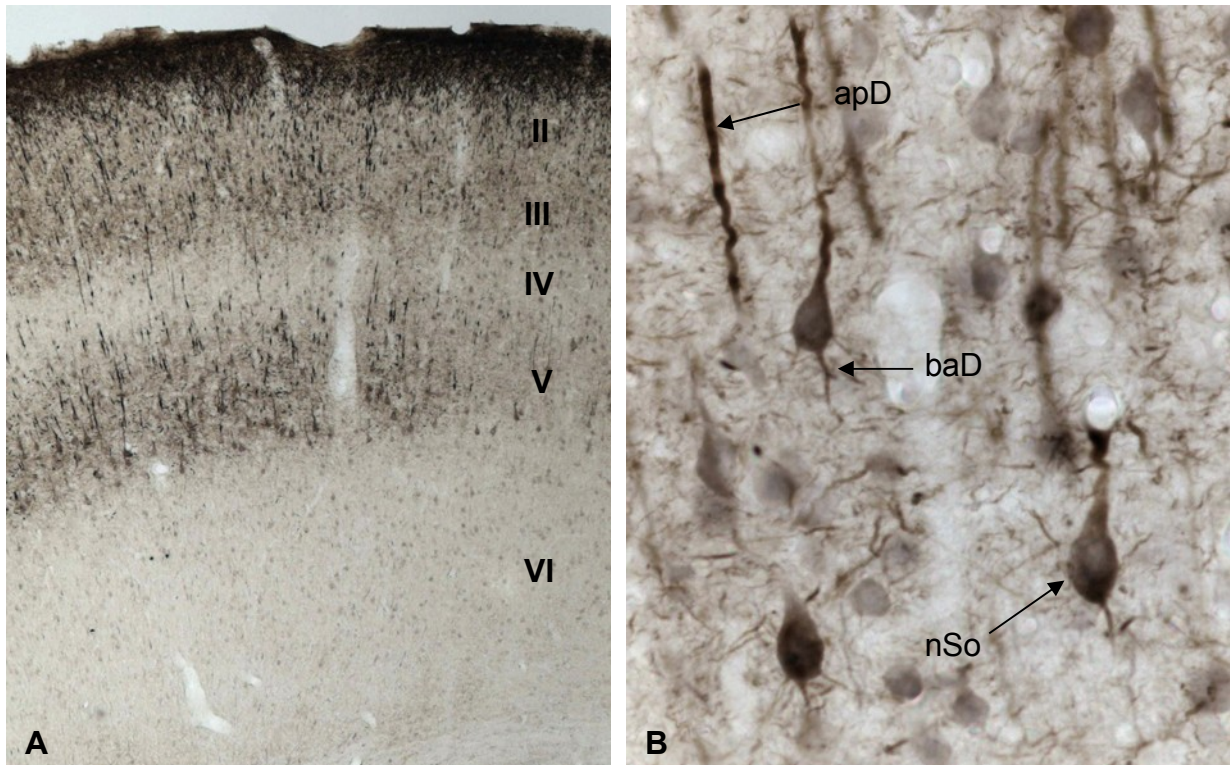
### **3.2 Lichtmikroskopische Verteilung der Immunreaktivität von Neuroligin 1, Synaptophysin und S100-Protein im Neokortex**

Bei der Auswertung der Ergebnisse ergab sich für den Neokortex die Notwendigkeit, eine Möglichkeit zur Vergleichbarkeit der immunhistochemischen Anfärbung der Hirnschnitte zu entwickeln. Eine Schwierigkeit in der quantitativen Beurteilung der jeweiligen Immunreaktivität lag in der nicht-linearen Entwicklung der Farbintensität während der DAB-Reaktion. Aufgrund dieser Nicht-Linearität war die Bestimmung eines absoluten, „mittleren Standardwertes“ unmöglich. So war es angesichts einer im Folgenden genauer beschriebenen, hohen Variabilität des Verteilungsmusters der Neuroligin 1-, Synaptophysin und S100-Protein-Immunreaktivität (NL1-IR, Syn-IR und S100-IR) nur semiquantitativ im Vergleich zu einem zu definierenden Standard möglich.

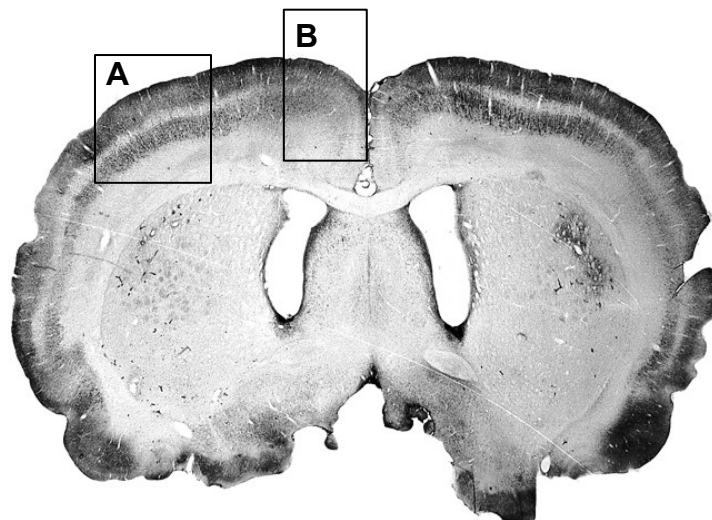
Auf diese Weise konnten sämtliche Verteilungsmuster relativ zum definierten Standardmuster beschrieben werden. Dabei wurde das Ausmaß der Färbintensität eines kortikalen Areals relativ zur mittleren Farbintensität des gesamten Schnittes beurteilt. Eine Veränderung der Immunreaktivität musste dabei in drei aufeinander folgenden Schnitten vorhanden sein, um methodische Artefakte auszuschließen.

Das Standardmuster für die Neuroligin 1-Immunreaktivität (NL1-IR) zeigte regelmäßig dicht angefärbte Bänder, die sich scharf abgegrenzt jeweils supragranulär und in Lamina V befanden (Abb. 12 A und 13, Ausschnitt A). Die Immunfärbung war vorwiegend in Somata und Dendriten von Pyramidenzellen lokalisiert (Abb. 12 B). Dabei verlief die Anfärbung von Lamina V regelmäßig und ohne scharfe Begrenzung in die medianen Kortextbereiche (sekundärer Motorkortex und Cingulärer Kortex) (Abb. 13, Ausschnitt B).

An Intensitätsschwankungen innerhalb dieses Standardmusters waren folgende Varianten feststellbar: 1. Eine Verminderung der Färbintensität in Lamina I – III und/oder Lamina V. 2. Eine Anfärbung von Lamina IV.

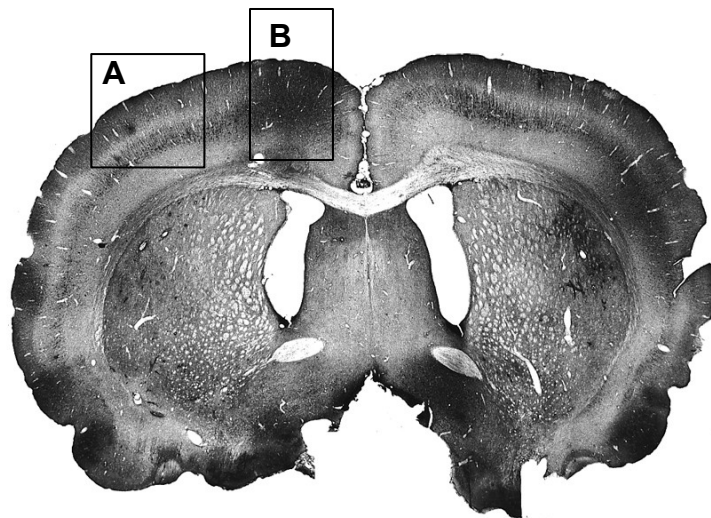


**Abb. 12:** Frontalschnitte durch den mit Neuroligin-Antikörper gefärbten Neokortex einer Ratte 1 Tag postoperativ. Die römischen Ziffern in (A) bezeichnen die Schichten. In (B) kennzeichnen die Pfeile einen apikalen Dendriten (apD), einen basalen Dendriten (baD) und ein neuronales Soma (nSo) .

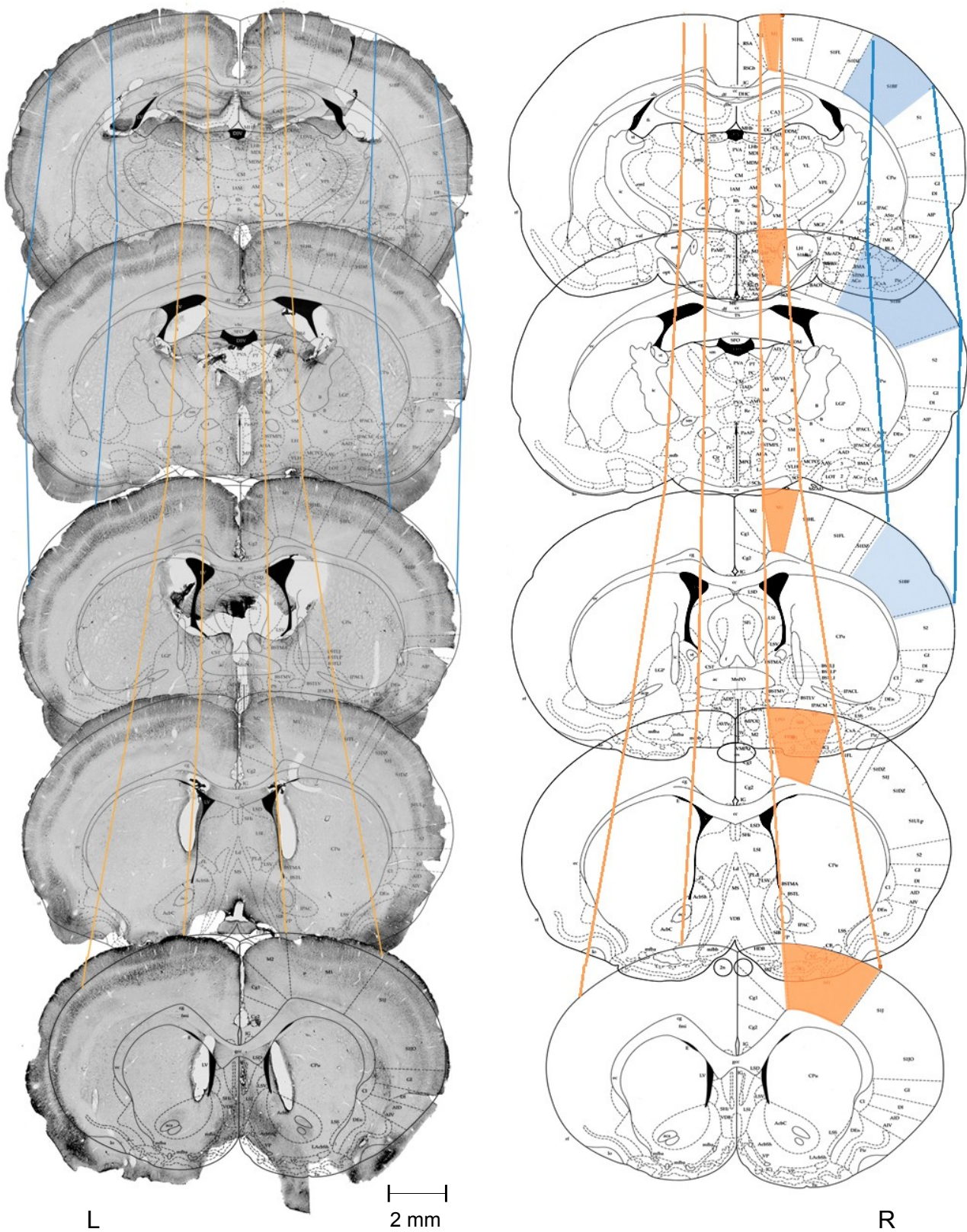


**Abb. 13:** Frontalschnitt durch den mit Neuroligin-Antikörper gefärbten Neokortex einer Ratte 1 Tag postoperativ. Ausschnitt A zeigt das Standardmuster für die Neuroligin-Immunreaktivität (NL-IR). Ausschnitt B beinhaltet den sekundären Motorkortex und den cingulären Kortex

Bei der S100-Immunoreaktivität waren zwei verschiedene Markierungstypen feststellbar, abhängig von den jeweils gefärbten Strukturen. Zum einen fanden sich Areale, in denen neben Astrozyten auch Pyramidenzellen in den Laminae I-III und V mit S100 angefärbt waren. Die Laminae waren so wie bei der NL-IR scharf abgegrenzt (Abb. 14, Ausschnitt A). Abweichend davon fanden sich Areale mit verstärkter S100-Markierung in Form eines gleichmäßig gefärbten, durch alle Laminae reichenden, homogenen Musters, dessen Strukturen lichtmikroskopisch nicht auflösbar waren (Abb. 14, Ausschnitt B). Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um kleine Fortsätze und Lamellen von Astrozyten handelt (Rickmann et al. 1995). Ob dieses zweite Muster als Standard zu werten ist, kann nicht entschieden werden, da es häufig mit variabler Lokalisation auch in Kontrolltieren vorkam.



**Abb. 14:** Frontalschnitt durch den mit S100-Antikörper (S100-AK) gefärbten Neokortex einer Ratte 1 Tag postoperativ. Ausschnitt A zeigt das Markierungsmuster I für die S100-Immunreaktivität (S100-IR). Hier sind neben Astrozyten auch Pyramidenzellen in den Laminae I-III und V mit S100 angefärbt. Die Laminae sind so wie beim Standardmuster für die NL-IR scharf abgegrenzt. Ausschnitt B zeigt das Markierungsmuster II für die S100-IR. Es zeigt eine alle Laminae überlagernde Färbung mit S100-AK



**Abb. 10:** Ausgewählte Serienschritte welche die untersuchte Kortexregion umfassen. Die Schemazeichnungen aus dem Atlas von Paxinos und Watson 1998 (Figure 12, 16, 20, 24, 28) (rechts im Bild) wurden über die Schnittbilder projiziert (links im Bild) um die kortikalen Areae zu bestimmen. Motorischer Cortex (MI) orange, somatosensorischer Cortex (SSI) blau. L = Links, R = Rechts

In normalen, unbehandelten Tieren entsprach die NL1-IR (in den supragranulären Schichten und in Lamina V) dem Standardmuster, wobei die Färbeintensität in gleichen Hirnregionen unterschiedlicher Tiere variierte (Abb. 15). Beim Vergleich der kortikalen Immunreaktivität von Neuroligin (NL1) und Synaptophysin (Syn) fiel bei kleiner Vergrößerung ein ähnliches bis gleiches Verteilungsmuster der beiden Antikörper auf (Abb. 16 A und C, D und F).

Bei der Betrachtung der S100-Immunreaktivität fanden sich wenige abgegrenzte Areale mit submikroskopischen, alle Laminae überlagernden Färbungen (Markierungsmuster II) und in einigen Arealen S100-immunoreaktive Neurone (Markierungsmuster I) (Abb. 16 B und E).

Beim Vergleich der kortikalen Immunreaktivität von NL1 und S100 fiel auf, dass sich in Arealen niedriger NL1-IR häufig in der S100-IR das Markierungsmuster II mit homogen intensiver Anfärbung aller Laminae fand, so dass sich das Bild reziproker Färbeintensitäten ergab (vergleiche ABB. 16 E und F).

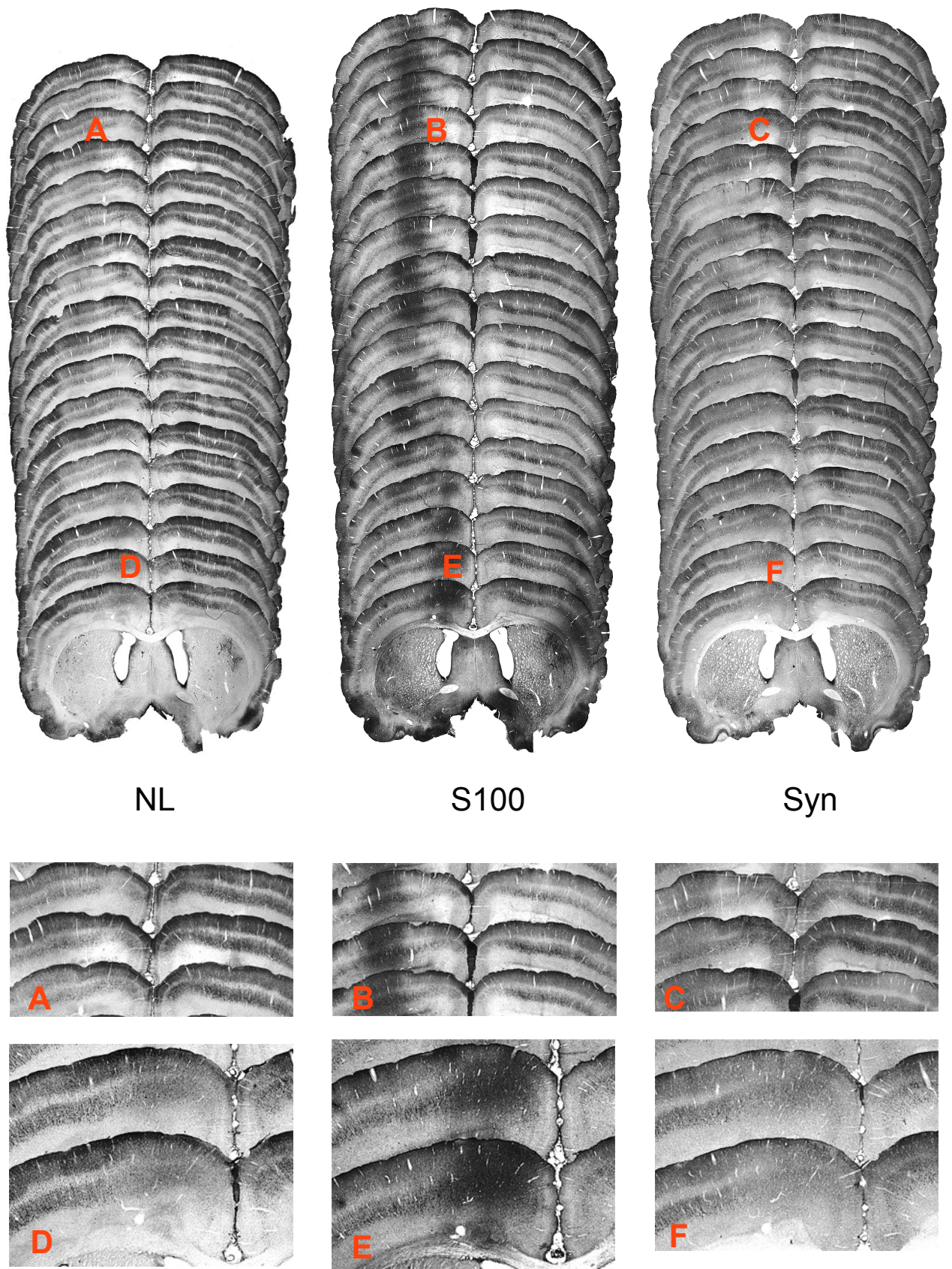
4 Stunden nach Läsion des Nervus facialis fand sich bei einem Versuchstier (La 40) ein beidseitig median gelegener, fronto-okzipitaler Streifen erniedrigter NL1-IR im Neokortex (Abb. 17 A, Pfeil). Dieser Streifen entspricht nach Paxinos und Watson dem primär motorischen Kortex (MI) (Paxinos und Watson 1989). Diese erniedrigte NL-IR korrelierte mit erhöhter S100-IR im selben Areal des gleichen Tieres (Abb. 17 B, Pfeil).

Dasjenige Areal, das dem kontralateral zur Läsion gelegenen somatosensorischen Kortex (SI) entsprach, wies eine im Vergleich zur ipsilateralen Seite erhöhte NL1-IR (Abb. 17 A links des Pfeiles), sowie eine erniedrigte S100-IR (Abb. 17 B links des Pfeiles) auf.

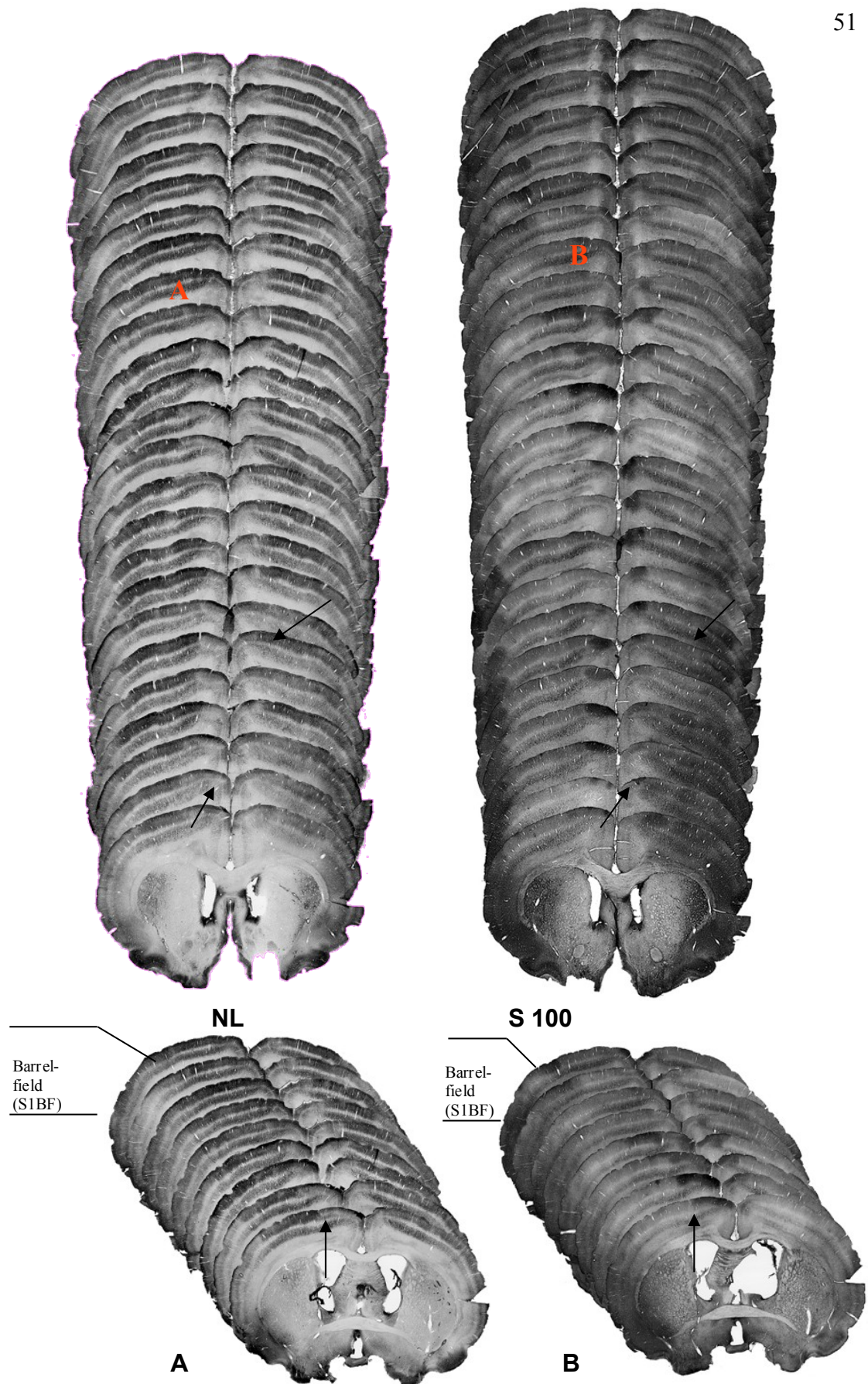
Des weiteren fand sich ein im lateralen SI gelegener, fronto-okzipitaler Streifen erniedrigter NL-IR kontralateral zur Läsion. Dieser Streifen entsprach der Position und Ausdehnung des „barrel field“ im SI (Abb. 17 A). Diese Region niedriger NL-IR korrelierte mit einem Areal vergleichsweise erhöhter Immunreaktivität von S100 (Abb. 17 B).

1 Tag nach Läsion des Nervus facialis fanden sich in drei von vier der Tiere median gelegene, fronto-okzipitale Streifen erniedrigter NL1-IR ipsi- und/oder kontralateral zur Läsion (Abb. 18).

In einem exemplarisch herausgegriffenen Tier zeigte sich eine Region vergleichsweise stark erniedrigter NL1-IR in dem Areal, das in Position und Ausdehnung dem ipsilateralen sekundären Motorkortex (M2) entsprach (Abb. 19 A und C ). Im ipsilateralen primären Motorkortex (M1)

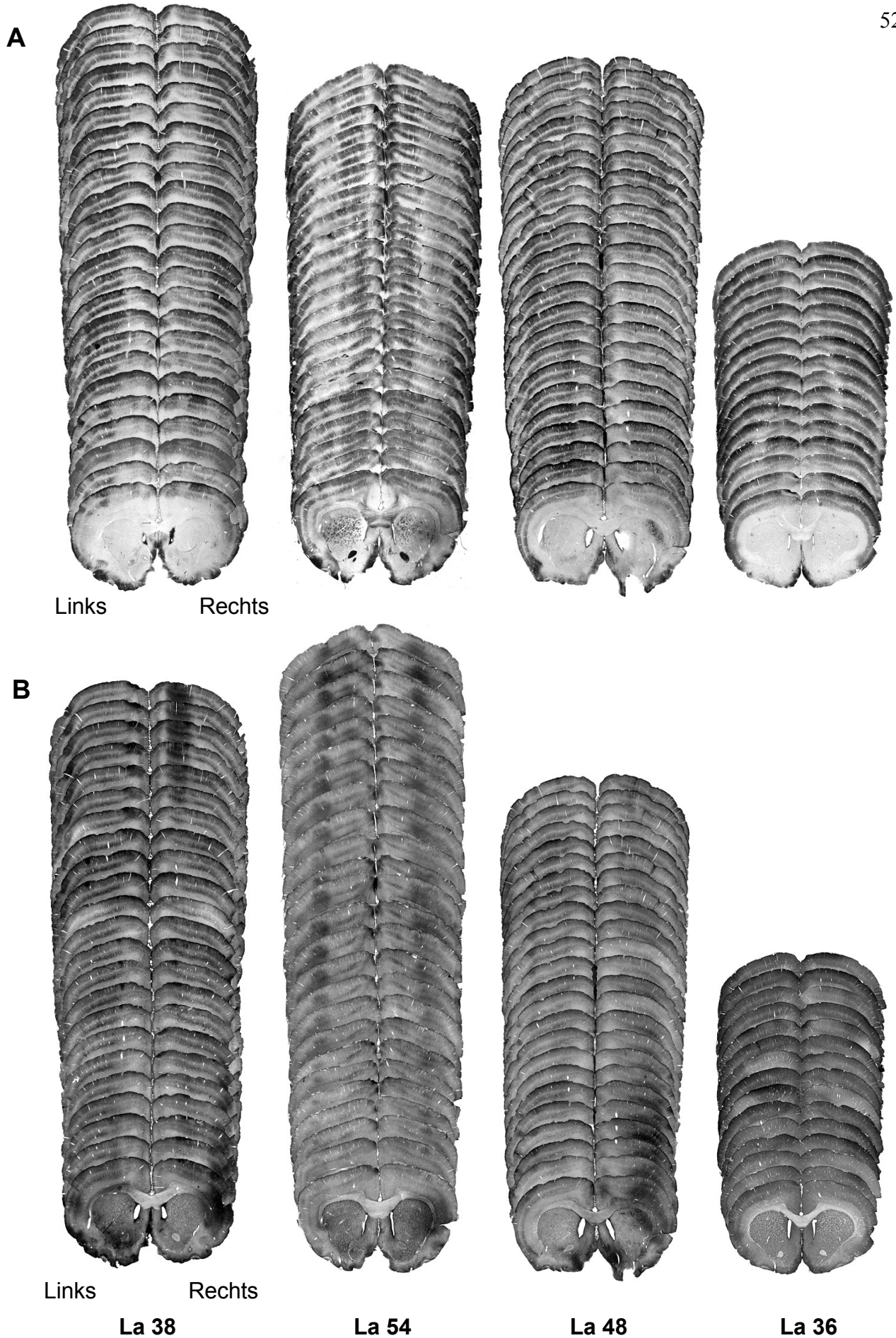


**Abb. 16:** Frontalschnitt durch den Kortex eines normalen Tieres (La37). A und D: Anfärbung mit NL, B und E: Anfärbung mit S100, C und F: Anfärbung mit Synaptophysin

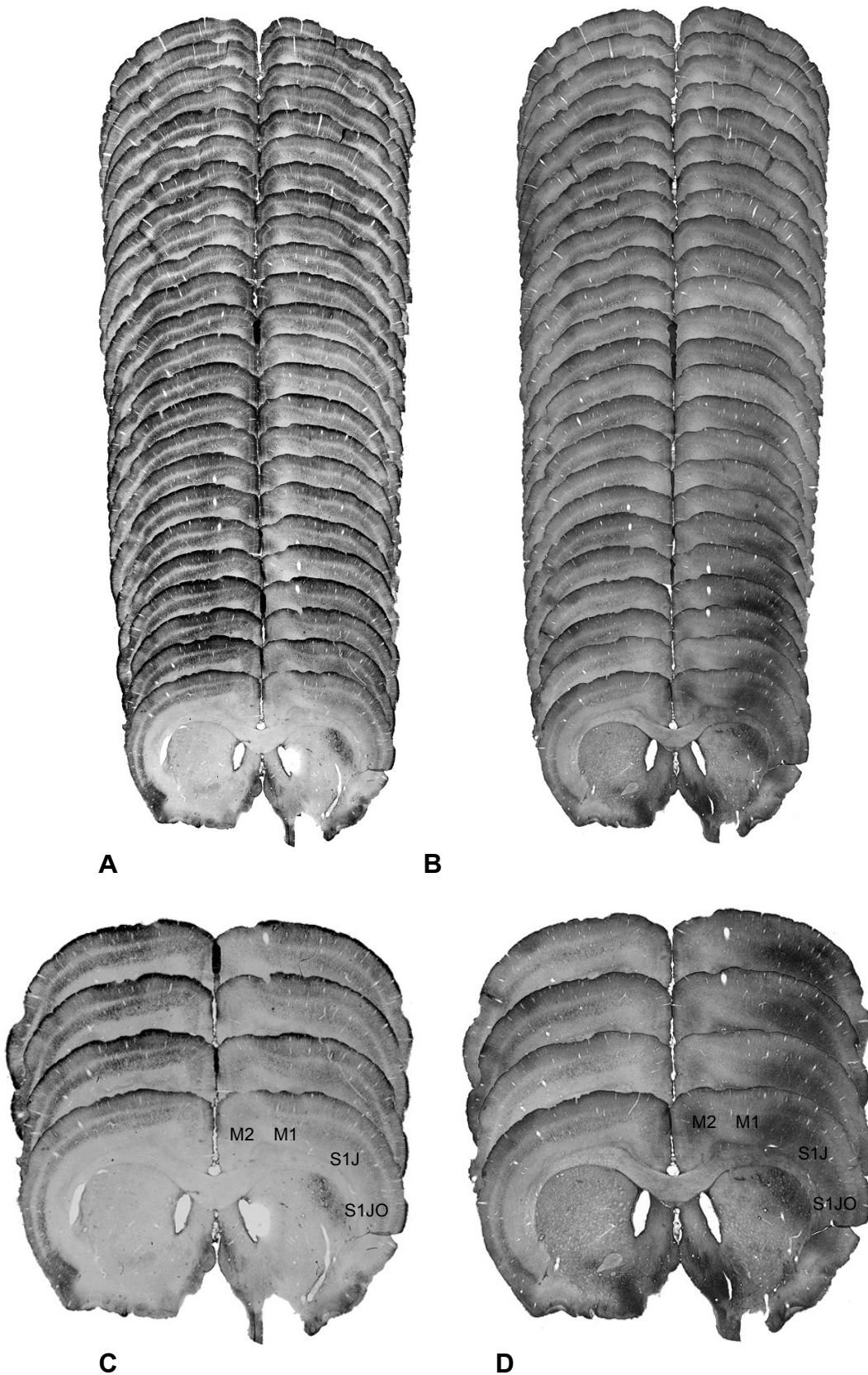


**Abb. 17:** Frontalschnitt durch den Cortex eines fazialisläsionierten Tieres 4 Stunden postoperativ. Die durch die Pfeile in A und B bezeichneten Stellen entsprechen der Lokalisation des MI nach Paxinos und Watson (1989). Das in (A) lateral des Pfeiles gelegene Areal entspricht der somatosensorischen Repräsentation der hinteren Extremität (S1HL), sowie weiter lateral der vorderen Extremität (S1FL). Lateral hiervon befindet sich das „barrel field“ (S1BF).





**Abb. 18:** Frontalschnitte durch den Cortex fazialisläsionierter Tiere 1 Tag postoperativ. (A) NL-IR, (B) S100-IR). La 38, La 54, La 48, La 36 = Kennziffern der Versuchstiere.



**Abb. 19:** Frontalschnitte durch den Kortex eines fazialisläsionierten Tieres (La48) 1 Tag postoperativ. Dargestellt ist die Immunfärbung mit Neuroligin 1 (A und C) und mit S100 (B und D). M1 = Primärer Motorkortex, M2 = Sekundärer Motorkortex, S1J = Somatosensorischer Cortex, Unterkieferregion, S2JO = Somatosensorischer Cortex, Mundoberfläche. Die S100-IR weist im Bereich des rechten somatosensorischen Kortex das Markierungsmuster II auf, während die NL1-IR im entsprechenden Areal desselben Tieres im Seitenvergleich erniedrigt ist.

hingegen war die NL1-IR im Seitenvergleich weniger erniedrigt. In der entsprechenden kontralateralen MI-Region hingegen fand sich eine im Seitenvergleich hohe NL1-IR die mit einer mäßigen Anfärbung von neuronalem S100-Protein einherging. Eine hohe submikroskopische Immunreaktivität von S100 fand sich lateral des ipsilateralen MI. Diese angefärbte Region entsprach dem lateralen M1 und der angrenzenden somatosensorischen Repräsentation der Kieferregion (Abb. 19 B und D). Beide Antikörperfärbungen waren im Bereich des Corpus striatum auf der ipsilateralen Seite erhöht.

3 Tage nach Läsion des Nervus facialis waren die median in M1 und M2 gelegenen, fronto-okzipitale Streifen erniedrigter NL1-IR ipsi- und kontralateral zur Läsion ebenfalls erkennbar (Abb. 20 B). In einem Versuchstier (La 43) zeigte sich eine Region vergleichsweise stark erniedrigter NL1-IR in dem Areal, das in Position und Ausdehnung dem ipsilateralen "barrel field" entsprach. Der kontraletale SI war im Gegensatz hierzu im vorderen Bereich (Bregma 1.0 bis 0.3) weitgehend homogen angefärbt. Weiter okzipital (ab einer Position von Bregma -0.3) war die NL1-IR ebenfalls reduziert. Im ipsilateralen primären Motorkortex (M1) war die NL1-IR im Seitenvergleich unauffällig, im kontralateralen MI hingegen stark erniedrigt. Die in der kontralateralen MI-Region hohe NL1-IR ging mit einer vermehrten submikroskopischen Anfärbung von S100-Protein einher (Abb. 20 A). Eine hohe submikroskopische Immunreaktivität von S100 fand sich auch im ipsilateralen „barrel field“. Beim Vergleich der beiden Antikörper zeigte sich ein deutlich reziprokes Färbeverhalten.

5 Tage nach Läsion des Nervus facialis fanden sich interindividuell unterschiedliche Muster, aber auch einige Gemeinsamkeiten. Ein der M1 bzw. M2-Region entsprechender medial gelegener, fronto-okzipitaler Streifen erniedrigter NL1-IR war in einem Tier (Versuchstier La 41) kontralateral noch deutlich, ipsilateral noch schwach ausgeprägt (Abb. 22). In einem anderen Versuchstier (La 55) war die NL-IR im Gegensatz zur Anfärbung des übrigen Kortex im MI beidseits leicht erniedrigt. In einem weiteren Tier (La 56) war die NL1-IR in diesem Areal wieder unauffällig ausgeprägt (Abb. 21). In dem Versuchstier La 41 war die NL1-IR bei detaillierter Betrachtung des kontralateralen MI nur in dessen lateralen Teil erniedrigt, S100-IR war hier hingegen erhöht. Im Zentrum des dem ipsilateralen somatosensorischen Kortex entsprechenden Areals zeigte sich eine Region vergleichsweise erniedrigter NL1-IR wohingegen die S100-IR hier deutlich erhöht war. Dafür war die S100-IR in den an den SS1 medial und lateral angrenzenden Kortexregionen erhöht

(Abb. 23). Die NL1-IR des dem kontralateralen SI entsprechenden Areal war im Seitenvergleich und im Vergleich mit den angrenzenden Kortextbereichen vermindert. Die S100-IR war lediglich im Zentrum dieses Areals erhöht. In dem Versuchstier La 56 fand sich vergleichsweise wenig NL-IR in M 2. Im medialen Bereich des kontralateralen SSI war die NL1-IR im Vergleich mit den übrigen Kortextbereichen erhöht. Lateral hieran angrenzend, d.h. im Kern des kontralateralen SS1 befand sich ein schmaler fronto-okzipitaler Streifen erhöhter S100-IR. Ein Streifen erhöhter S100-IR fand sich auch im Zentrum des kontralateralen SS1, lateral hiervon war die NL1-IR vermindert in dem der Kontrast zwischen der supra- und infragranulären Schicht nahezu aufgehoben war.

In dem Versuchstier La 55 war die NL1-IR beidseits in den dem M1 und M 2 entsprechenden Bereichen vergleichsweise erniedrigt. Die NL1-IR war im ipsilateralen SS1 im Vergleich zu den übrigen Kortextbereichen hoch, ebenso wie in einem schmalen fronto-okzipitalen Streifen im kontralateralen SSI. Die Färbung S100 war in diesem Tier relativ kontrastlos.

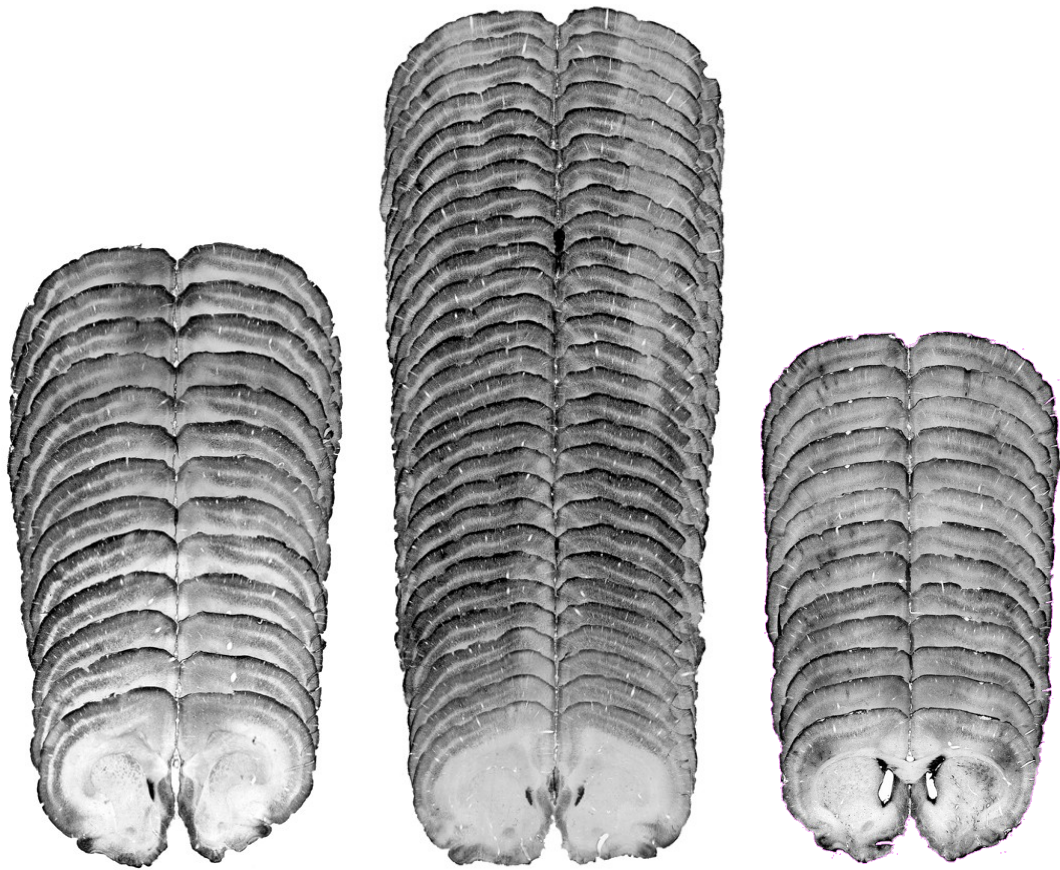
Insgesamt war die NL1-IR im ipsi- und/oder kontralateralen Motorkortex am häufigsten erniedrigt. In anderen kortikalen Regionen, oder Areae, so SSI, ergaben sich eigentlich ausschließlich interindividuelle Unterschiede.

10 Tage nach Läsion des Nervus facialis fanden sich wiederum sowohl interindividuell unterschiedliche Muster als auch Gemeinsamkeiten.

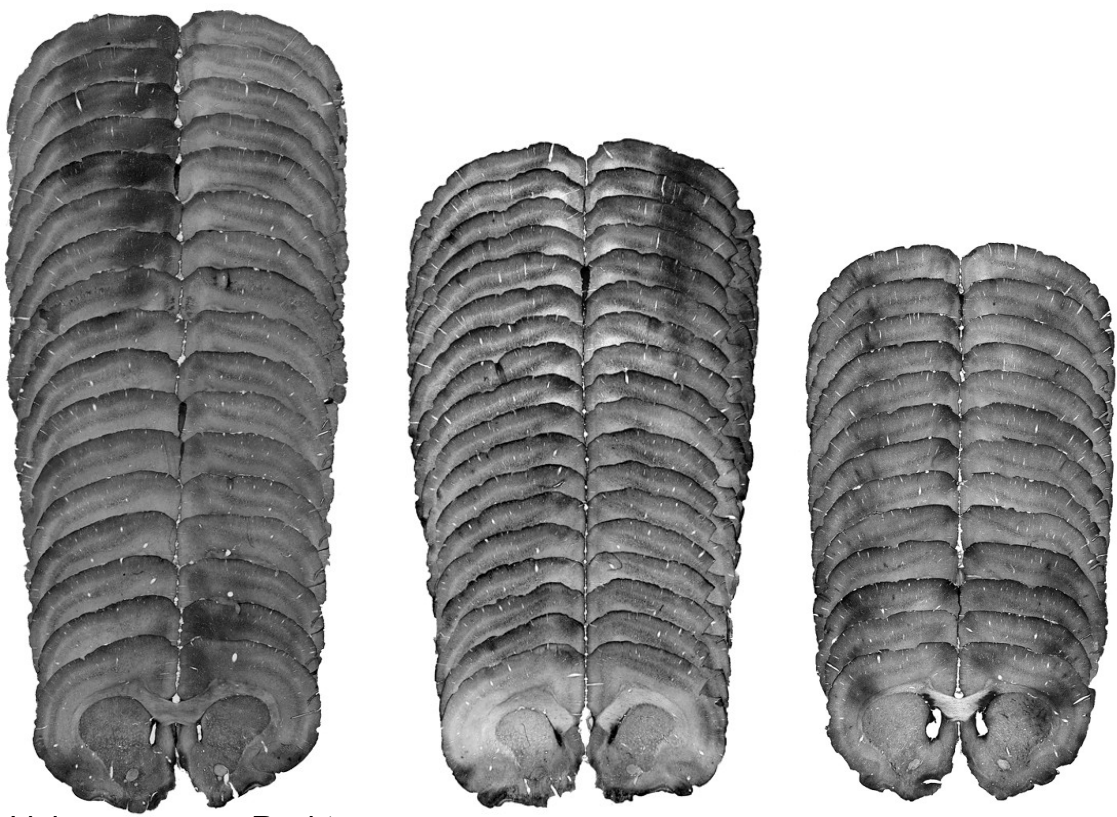
Ein der M1 bzw. M2-Region entsprechender medial gelegener, fronto-okzipitaler Streifen erniedrigter NL1-IR war in zwei Tieren (Versuchstier La 46 und La 57) kontralateral und ipsilateral deutlich ausgeprägt und umfasste einen größeren Bereich – den ganzen MI. In dem Versuchstier La 46 war die S100-IR reziprok zur NL1-IR im Bereich der M1 bzw. M2-Region erhöht. Dasjenige Areal, das in Position und Ausdehnung dem kontralateralen SSI entsprach, wies in La 46 eine Region vergleichsweise niedriger NL1-IR auf, die der Ausdehnung des „barrel field“ entsprach. Hier zeigte sich eine im Zentrum dieser Region erhöhte S100-IR in den supragranulären Schichten. Im Versuchstier La 57 zeigten sich in der dem kontralateralen MI entsprechenden Region anterior-posterior ausgerichtete Streifen unterschiedlicher Abstufungen der Färbeintensität. In diesem Tier waren die dem ipsi- und kontralateralen SSI entsprechenden Regionen sowohl bei der S100- als auch bei der NL1-Färbung homogen gefärbt. Im Vergleich der beiden Tiere zeigte sich, dass die Bereiche niedriger NL1-IR im MI von La 46 weiter nach lateral ausgedehnt waren als in La 57.

Insgesamt war also der kontralaterale MI bei Tier 46 stärker verändert, sowohl was verminderte NL1-IR im MI, als auch im SSI anbelangte.

A



B



Links

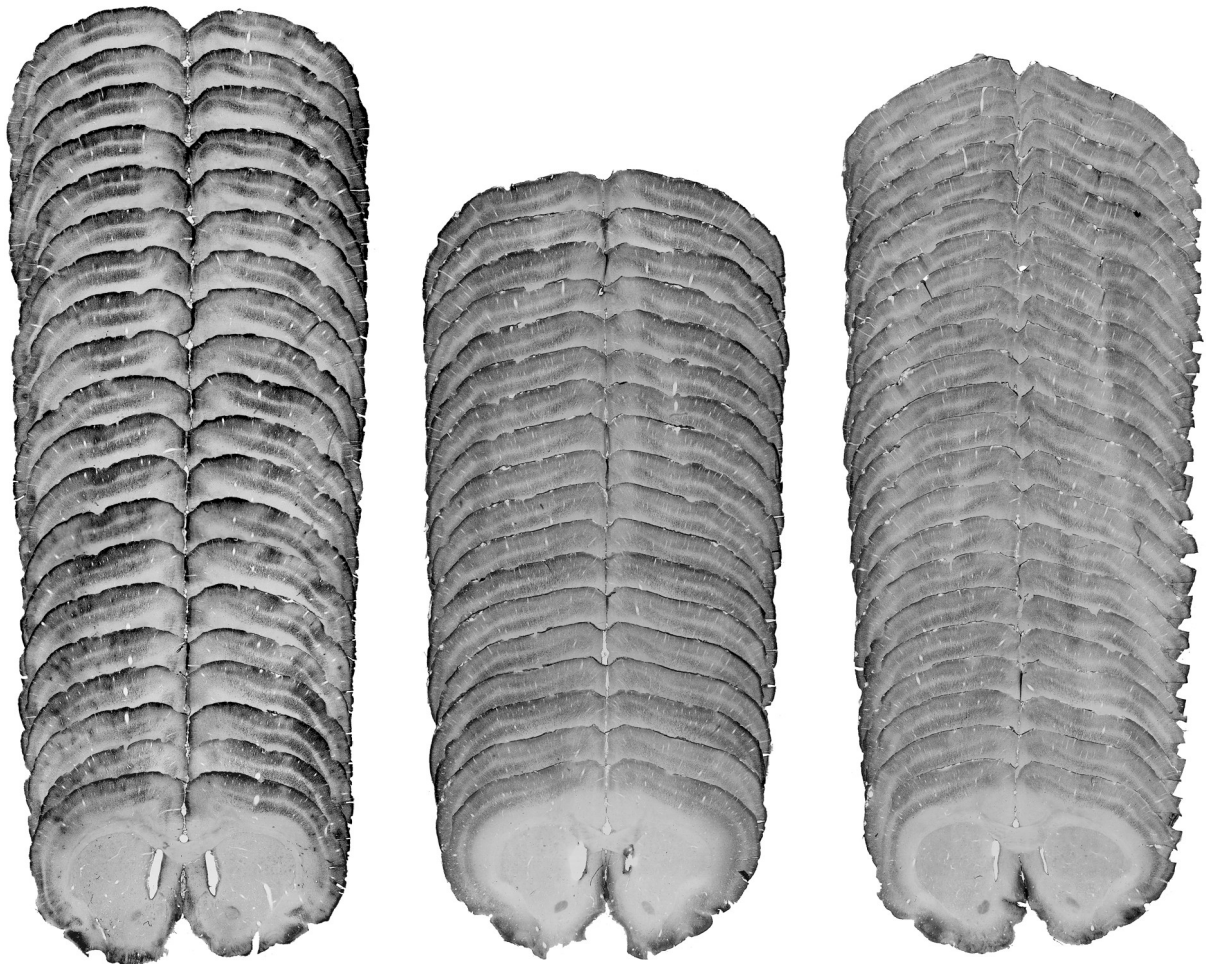
Rechts

La 45

La 43

La 53

**Abb. 20:** Frontalschnitte durch den Kortex fazialisläsionierter Tiere 3 Tage postoperativ. (A) NL-IR, (B) S100-IR. La 45, La 43, La 53 = Kennziffern der Versuchstiere.

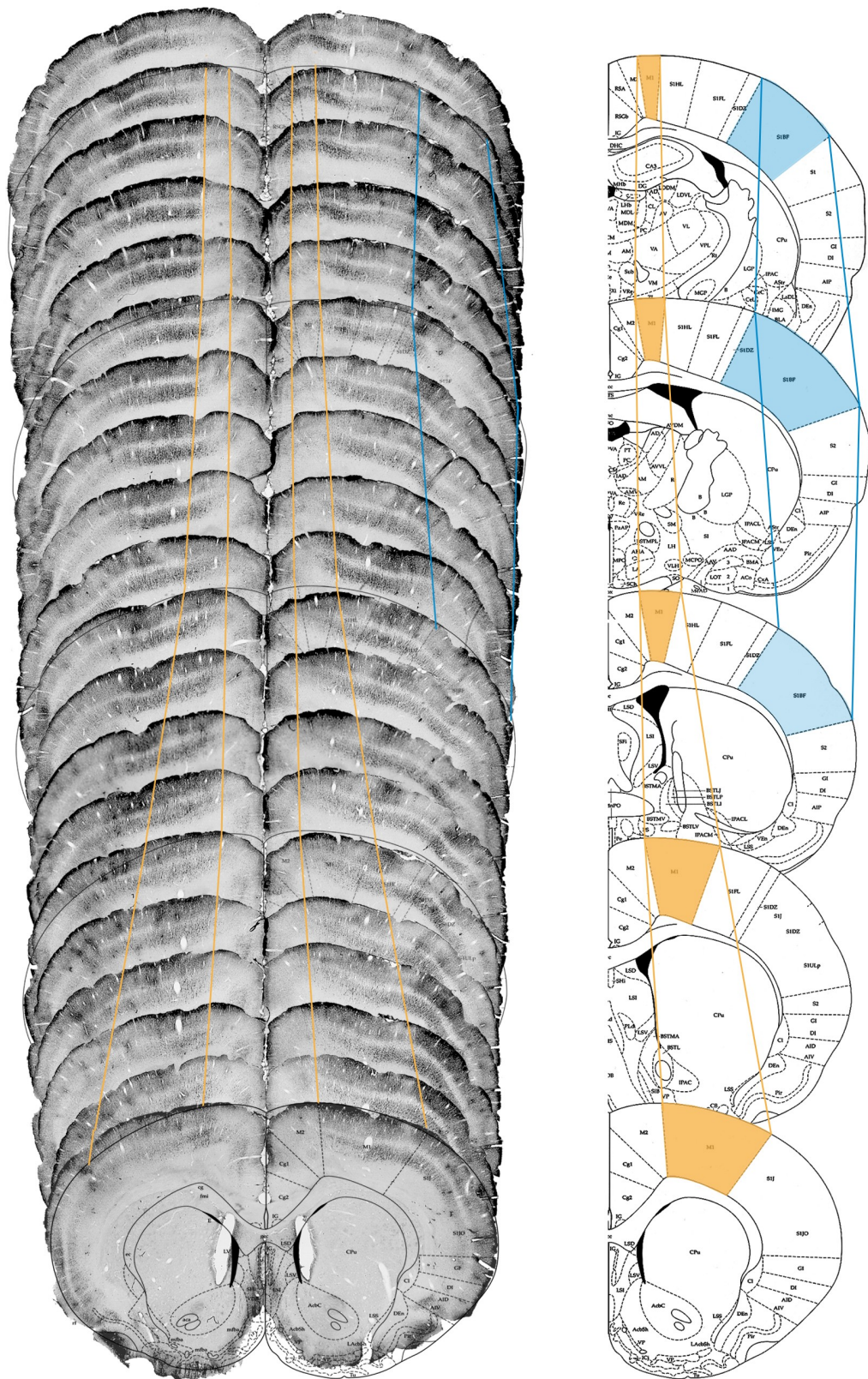


**A La 41**

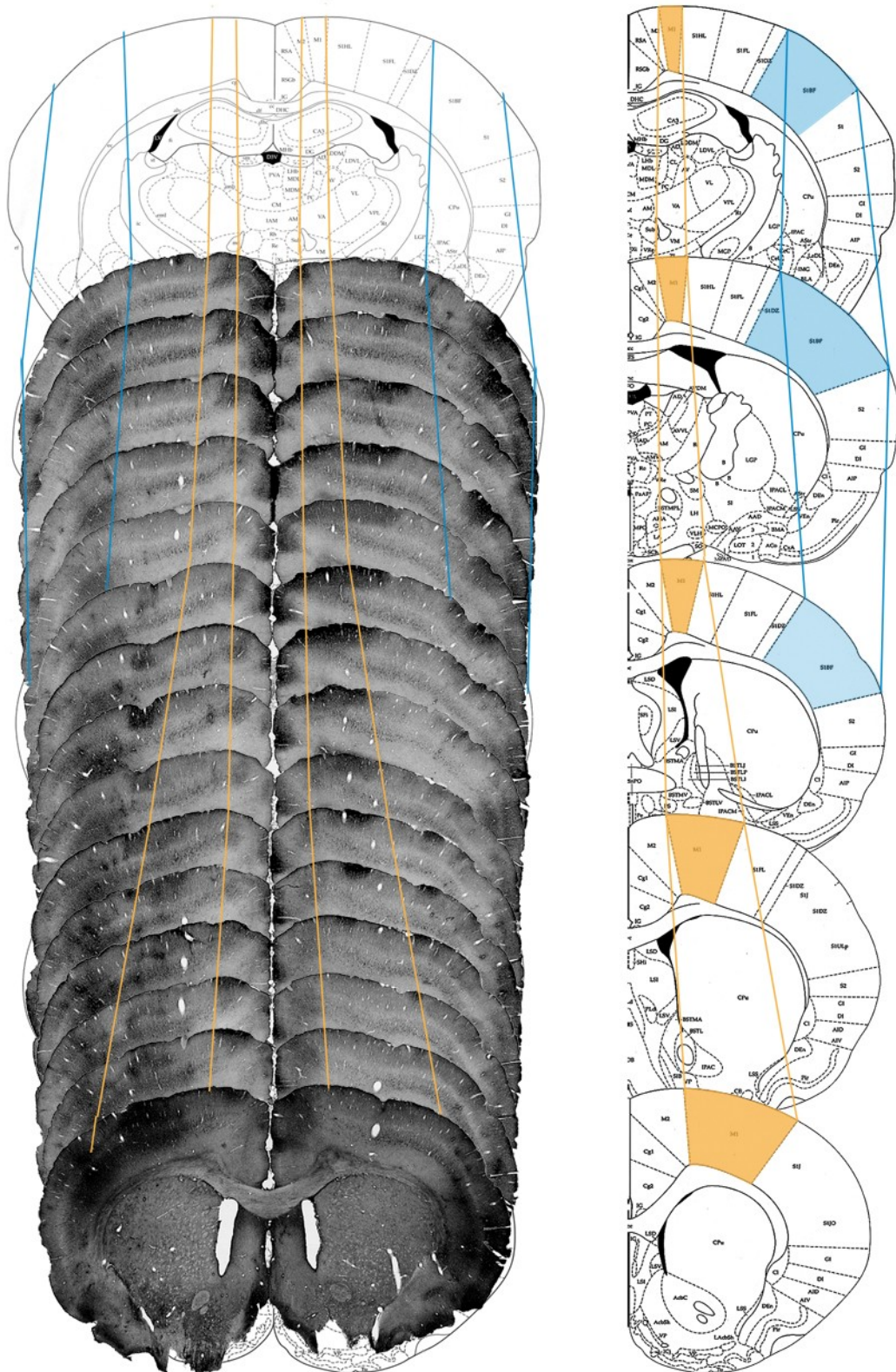
**B La 55**

**C La 56**

**Abb. 21:** Frontalschnitte durch den Kortex fazialisläsionierter Tiere 5 Tage postoperativ. (A) NL-IR, (B) S100-IR. La 41, La 55, La 56 = Kennziffern der Versuchstiere.



**Abb. 22:** Ausgewählte Serienschritte welche die untersuchte Kortexregion umfassen. Die Schemazeichnungen aus dem Atlas von Paxinos und Watson (1998) wurden über die Schnittbilder projiziert, um die kortikalen Aree zu bestimmen, primär motorischer Kortex (MI) orange, primär somatosensorischer Kortex (SI) blau. Hier Anfärbung mit Neurologin des Versuchstieres La 41



**Abb. 23:** Ausgewählte Serienschritte welche die untersuchte Kortexregion umfassen. Die Schemazeichnungen aus dem Atlas von Paxinos und Watson (1998) wurden über die Schnittbilder projiziert um die kortikalen Areae zu bestimmen, primär motorischer Kortex (MI) orange, primär somatosensorischer Kortex (SI) blau. Hier Anfärbung mit S100 des Versuchstieres La 41.



	MI R	MI L	SI R	BF R	SI L	BF L
<b>4 Std.</b>						
La 34						
La 40	↓↓	↓↓	~	~	↑	↓↓
<b>1 Tag</b>						
La 36	~	~ ↓↓	~	~	~	~
La 38	↓↓ (~)	↓↓	~	~	~	~
La 48	↓↓	~	~	~	~	~
La 54	~	~	~	~	~	~
<b>3 Tage</b>						
La 43	~	↓↓	↓↓			
La 45	↓↓	↓↓	~	~	~	~
La 53	~	~	~	~	~	~
<b>5 Tage</b>						
La 41	~ (↓)	↓↓	~	~	↓↓	↓↓
La 55	~	~ ↓	~	~	~	~
La 56	~	~	~	~	~	~
<b>10 Tage</b>						
La 46	↓↓	↓↓	~	~	~	↓↓
La 57	↓↓	↓↓ (~)	~	~	~	~

**Tabelle 3:** Änderung der Immunreaktivitäten von Neuroligin 1 (NL1) und Synaptophysin (Syn) im primären Motorkortex (MI), im primären somatosensorischen Kortex (SI) und hier im Besonderen im "barrel field" (BF) nach rechtsseitiger Fazialisläsion. R = Rechts, L = Links, ~ = unauffällige IR, ↓ = leicht erniedrigte IR, ↓↓ = stark erniedrigte IR, ↑ = leicht erhöhte IR, ↑↑ = stark erhöhte IR

Alles in allem lässt sich feststellen, dass es zu jeder Überlebenszeit große interindividuelle Unterschiede zwischen den Versuchstieren gab. Am häufigsten war die NL1-IR im primär motorischen Kortex erniedrigt, wobei beide Seiten betroffen sein konnten. Interessanterweise ergaben sich bei weniger als einem Drittel der Versuchstiere Veränderungen im primär somatosensorischen Kortex. Veränderungen der Immunreaktivität, die zunächst unsystematisch erschienen, entsprachen überdurchschnittlich häufig definierten funktionellen Areas. Regelmäßigkeiten zeigten sich beim Vergleich der unterschiedlichen Antikörper (NL1/Syn, NL1/Syn - S100).

## **4 Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels immunhistochemischer Methoden die spezifische Verteilung prä- und postsynaptischer Proteine (Neurologin 1 und Synaptophysin) und die Lokalisation des Gliamarkers S 100 im Hirnstamm und im primären motorischen Kortex (MI) adulter Ratten nach Fazialisläsion untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die räumlichen Verteilungsmuster der Immunreaktivität von Neurologin 1 und Synaptophysin in ihrem zeitlichen Verlauf nach Fazialisläsion in allen untersuchten Hirnstrukturen in erheblichem Umfang gleichen. Des Weiteren konnte ein häufig auftretendes, reziprokes Verteilungsmuster dieser beiden Antikörper mit dem Färbemuster des Gliamarkers S100 beobachtet werden.

### **4.1 Methodische Einschränkungen**

Für die Beurteilung und Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit sind verschiedene methodeninhärente Beschränkungen zu berücksichtigen. Hierzu muss man sowohl die bei der Immunzytochemie relevante Zugänglichkeit der Antigene des fixierten Gewebes für die Antikörper, als auch die Eindringtiefe der Antikörper zählen. Eine weitere Beschränkung ist die Nicht-Linearität der hier genutzten histochemischen Nachweisreaktionen, welche gewählt wurden, um Schnitte im lichtmikroskopischen Hellfeld auswerten zu können. Da von einem innerhalb eines Schnittes vorliegenden gleichmäßigen Färbeverhalten auszugehen ist, ist trotz der genannten Einschränkungen eine semiquantitative Auswertung der Schnittpräparate möglich. Die in dieser Arbeit vorgenommene semiquantitative Auswertung bestand in einem Seitenvergleich gleicher ZNS-Strukturen innerhalb eines Versuchstieres, sowie in dem anschließenden Vergleich dieser Befunde mit anderen Tieren derselben Überlebenszeit. Ein ähnliches Vorgehen wurde in thematisch verwandten Arbeiten (Laskawi et al. 1997, Landgrebe et al. 2000) erfolgreich durchgeführt.

Beim Färbeverhalten der verschiedenen miteinander zu vergleichenden Schnitte sind Färbedefekte und Schwankungen nie vollständig auszuschließen. Diese methodisch bedingten Färbeunterschiede berücksichtigten wir in unserer Auswertung auf zweierlei Weise: a) die Beurteilung der

immunhistochemischen Färbungen anatomischer Strukturen wurde im Seitenvergleich sowie im Vergleich zu anderen nicht betroffenen Regionen des gleichen Schnittes vorgenommen; b) ein Färbeunterschied floss nur dann als aussagekräftiger Befund in die Auswertung ein, wenn er in drei anatomisch aufeinander folgenden Schnitten gleichermaßen in der entsprechenden anatomischen Struktur sichtbar war. Das reziproke Färbeverhalten von S100 und NL1 im Kortex zeigt dabei eindeutig, dass es sich bei der Verteilung der Immunreaktivität nicht um einen Artefakt, sondern um relevante und aussagekräftige Färbeunterschiede handelt.

Infolge dieser strengen Anforderungen schlossen wir die experimentelle Überprüfung einiger der initial angestellten Überlegungen anhand der gewonnenen immunhistochemischen Präparate aus. Dies betraf diejenigen Hypothesen, welche sich auf anatomische Regionen von sehr kleiner Größe bezogen. Da es für die hier unternommene Arbeit notwendig war, drei verschiedene Antikörper an näherungsweise identischen anatomischen Regionen eines einzelnen Tieres anzuwenden, mussten alternierende Schnitte eines Rattenhirns für die Färbungen verwandt werden. Dies vergrößerte die Abstände zwischen zwei jeweils mit einem Antikörper angefärbten Hirnschnitten. So führte die geringe Anzahl vorliegender Serienschnitte beispielsweise des Thalamus dazu, dass die Befundung des Färbeverhaltens in dieser Region zu wenig aussagekräftig war, um ausgewertet werden zu können. Vergleichbar unzureichende Beurteilungssituationen betrafen den relativ kleinen Nucleus ventralis posteromedialis (VPM), sowie auf Hirnstammebene den Nucleus principalis nervi trigemini. Folgende Regionen konnten experimentell überprüft werden: Nervus facialis, Nucleus spinalis nervi trigemini, primärer Motorkortex.

## **4.2 Lichtmikroskopische Veränderungen nach Fazialisaxotomie**

Die in dieser Arbeit untersuchten, immunhistochemisch detektierbaren Befunde im Nucleus facialis und im Motorkortex erlauben Rückschlüsse auf neuronale und gliöse strukturelle Veränderungen in diesen Regionen nach Fazialisaxotomie. Auf neuronaler Ebene betreffen diese Veränderungen die Ausprägung von durch Synaptophysin (Syn) nachweisbaren Vesikeln, sowie die Ausprägung des postsynaptisch lokalisierten Synapsenadhäsionsmoleküls Neuroligin 1 (NL1). Auf gliöser Ebene betreffen die Veränderungen die Ausprägung des S-100-Proteins, das hauptsächlich (aber nicht ausschließlich) intrazellulär in Astrozyten, und in geringem Ausmaß in Neuronen vorliegt.

Im Folgenden werden zunächst die in dieser Arbeit vorliegenden Befunde im Fazialiskern (Nuc 7) diskutiert. In diesem Zusammenhang werden einige der zum aktuellen Zeitpunkt bekannten

neuronalen und gliösen Reaktionen auf Fazialisaxotomie in der Ratte vorgestellt, wobei auch auf das so genannte "synaptic stripping" eingegangen wird.

Anschließend werden die in dieser Arbeit entstandenen Ergebnisse auf Ebene des primären Motorkortex (MI) diskutiert, wobei auch auf ähnliche Arbeiten aus unserem Labor verwiesen wird.

#### **4.2.1 Strukturelle Veränderungen nach Fazialisaxotomie im Nucleus facialis**

Der Vorteile der extrakranial erfolgenden Durchtrennung des Fazialisnerven, des in Kapitel I.3 vorgestellten und neurowissenschaftlich fest etablierten Fazialismodells, bestehen in der Vermeidung eines direkten ZNS-Traumas ohne Verletzung der Bluthirnschranke. So wird zum einen die direkte Reizung von Astrozyten und zum anderen eine Kontamination durch den Eintritt von auf dem Blutweg übertragbaren Elementen vermieden (Streit und Kreutzberg 1988). Die periphere Fazialisaxotomie führt dennoch zu einer komplexen Gewebereaktion im ZNS, genauer gesagt in der nächsten Umgebung des verletzten Motoneurons. Diese Reaktion beinhaltet strukturelle, metabolische, elektrophysiologische und molekulare Veränderungen der involvierten Nervenzellen, seiner Dendriten und der benachbarten Gliazellen. Bereits 1974 berichtete Watson von einer vermehrten Synthese von Strukturproteinen nach Axotomie, sowie von einer Abnahme der für die Transmittersynthese verantwortlichen messenger RNA (Watson WE 1974). Andere Veränderungen auf der Ebene der RNA, beteiligter Proteine und der Proteinsynthese wurden dokumentiert (Lieberman 1971).

##### **4.2.1.1 Neuronale Reaktionen auf Fazialisaxotomie im Nucleus facialis**

Motoneurone reagieren mit einer Vielzahl von Veränderungen auf Läsionen ihrer peripheren Axone. Da die Proteinsynthese des Neurons auf den Zellkörper beschränkt ist, ist der distal der Läsion gelegene Teil des Axons vom neuronalen Stoffwechsel abgeschnitten, so dass er folglich mitsamt seinen Myelinscheiden degeneriert (Waller'sche Degeneration). Der proximale Anteil des Neurons unterliegt in der Regel entweder Apoptose, oder zumindest einer chromatolytischen Reaktion, die mit metabolischen Veränderungen auf der Basis von strukturellen und molekularen Modifikationen im Perikaryon einher geht. Die Anzahl der von Zelltod betroffenen Neurone in zentralen Kernen

nach peripherer Nervenläsion ist hoch variabel. In der erwachsenen Ratte überleben die meisten fazialen Motoneurone die Axotomie des Nervus facialis (Streit und Kreutzberg 1988, Mattsson et al. 2001). Die axonale Regeneration der Fazialisneurone scheint bei der Ratte etwa 11 bis 14 Tage nach Axotomie abgeschlossen zu sein (Tetzlaff et al. 1988 a). Hierbei haben sowohl metabolische als auch genetische Stimuli Schlüsselfunktionen bei der Initiierung dieser Regenerationsprozesse. Dabei spielen trophische Faktoren, die Neutrophine, eine Familie niedrigmolekularer Proteine, eine große Rolle. Zu ihnen gehören u.a. der nerve growth factor (NGF), der brain-derived neurotrophic factor (BDNF) oder der glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). Anhand der experimentell mittels Axondurchtrennung induzierten Unterbrechung der Interaktion zwischen einem Neuron und dessen Ziel konnte gezeigt werden, dass der axonale Transport neurotropher Faktoren, oder aber ihre Effektoren, für die neuronale Funktionsfähigkeit benötigt werden (Hendry et al. 1974). Anhand des Fazialismodells konnte bei der Ratte gezeigt werden, dass in einem synthetischen Führungskanal, der eine 8 mm lange Lücke des Fazialisnerv überbrückte, kontinuierlich freigegebenes GDNF die Axonregeneration förderte (Barras et al. 2002).

Als ein die Regeneration fazialer Motoneurone beschleunigender Faktor konnten auch Polyamine nachgewiesen werden (Gilad VH et al. 1996). Diese sind in DNA-Replikations- und RNA-Synthesevorgänge involviert. Ein Anstieg der RNA- und Proteinsynthese, sowie eine Änderung der Genexpression können zu einer erfolgreichen axonalen Regeneration führen (Kandel 2000). Bereits in den 80er Jahren war ein nach neuronalen Läsionen rasch auftretender, vorübergehender Anstieg der Polyaminsynthese beobachtet worden (Gilad GM und Gilad VH 1983). Eine Aktivität der Ornithindecaboxylase, einem für die Polyaminsynthese wichtigen Enzym, wurde bereits 5 - 8 Stunden nach Axotomie fazialer Motoneuronen in diesen gefunden (Tetzlaff und Kreutzberg 1985). Tetzlaff und Kreutzberg konnten zeigen, dass die circa 24 Stunden nach Axotomie maximal ausgeprägte Aktivität der Ornithindecaboxylase nach einer Woche wieder bis auf ein subnormales Niveau absank. Auf der Ebene der RNA waren C-jun, jun B und TIS 11 ebenfalls nach ca. 5-8 Stunden nach Axotomie erhöht, erreichten maximale Werte nach circa 24 Stunden und nahmen im Verlauf der anschließenden Woche wieder ab (Haas et al. 1993). Als weitere frühe neuronale Reaktion auf Axotomie ist die chromatolytische Reorganisation der neuronalen Nissl-Substanz zu nennen. Eine quantitative Analyse der Chromatolyse zeigte, dass diese Reaktion innerhalb von 8 Stunden nach Fazialisaxotomie erfolgte (Guntinas-Lichius et al. 1996).

Auch Veränderungen in der Ausprägung von Neurofilamenten wurden nach Läsionen gezeigt. Neurofilamente sind aus Protein-Untereinheiten unterschiedlichen Molekulargewichts bestehende

intermediäre Filamente, deren räumliche Anordnung zumindest teilweise als verantwortlich für die Regulation der Größe und Form eines Neurons angesehen wird. Tetzlaff et al. konnten circa 12 Stunden nach Fazialisaxotomie eine beginnende Verminderung der Synthese von Neurofilamenten im Nuc 7 von Ratten nachweisen (Tetzlaff et al. 1988 a). Auch Veränderungen in der mRNA-Expression für Zytoskelettproteine (Neurofilamente und Aktinpolypeptide) sowie für das GAP-43 (growth associated protein) der Motoneurone wurden beschrieben. Es wurde vermutet, dass die Phosphorylierung von Neurofilamenten mit dem Ausmaß der Querverbindungen von Neurofilamenten korreliert, welche Axonkaliber und -wachstum beeinflussen und somit offensichtlich in morphogenetische Prozesse involviert sind (Laskawi und Wolff 1996). Laskawi und Wolff versuchten, die Bedingungen für Änderungen des Phosphorylierungszustands von Neurofilamenten nach verschiedenen Arten von Läsionen des N. facialis zu definieren. In einer kleinen Subpopulation von Fazialisneuronen wurde eine erhöhte Immunreaktivität für phosphorylierte Neurofilamentepitope (pNF-IR) nach verschiedenen mechanischen Läsionen (Durchtrennung des N. facialis mit und ohne Befestigung eines Metallclips am proximalen Nervende, Nervenquetschung, kombinierte Trigemini- und Fazialisläsion) festgestellt. Diese Reaktion begann innerhalb von 2 Tagen nach der Operation und dauerte bis zu 2 Wochen. In solchen Tieren, in denen axonale Regeneration durch die Befestigung eines Metallclips am proximale Nervende verhindert wurde, blieb die pNF-IR auch über den Zeitraum von 2 Wochen hinaus bestehen. Eine selektive Durchtrennung des "Vibrissenanteils" des Nervus trigeminus induzierte keine offensichtlichen Änderungen in der pNF-IR im Nuc 7, allerdings eine kombinierte Läsion zusammen mit dem N. facialis (Laskawi und Wolff 1996).

Fest steht, dass die Axotomie eines Neurons in der Regel transsynaptische Effekte hat, die sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung wirksam sein können. Eine retrograd schädigende Reaktion kann zustande kommen, wenn ein afferentes Neuron nicht mehr ausreichend trophisch durch sein Zielneuron versorgt wird. Seit längerem ist bekannt, dass Neurotrophine Einfluss auf den neuronalen Metabolismus nehmen können. Sie werden an der Postsynapse vom innervierten Neuron, der so genannten Zielzelle, ausgeschüttet, und diffundieren über den synaptischen Spalt zur präsynaptischen Membran des Axonterminus, um dort an ihren spezifischen Rezeptor, den trk-Rezeptor, zu binden. Anschließend werden die Neurotrophine samt trk-Rezeptoren an der präsynaptischen Membran internalisiert (Hendry et al. 1974). Das solchermaßen in Form eines Ligand-Rezeptor-Komplexes verpackte trophische Signal wird zum Zellkern des innervierenden

Neurons weitergeleitet, indem es retrograd vom distalen Axon bis in dessen Soma transportiert wird. Auf diese Weise können Neurotrophinsignale vom Zielort eines Neurons zu dessen Perikaryon gelangen und hier sein Überleben, z.B. in Form von Wachstum und Genexpression, sichern (Yip und Johnson 1986, Ehlers et al. 1995, Halegoua et al. 1991). Die *trk*-Rezeptoren können während des retrograden axonalen Transportes aktiviert bleiben, und so auf mehreren Ebenen Kaskaden auslösen. Auf diese Weise kann bereits lokal axonales Wachstum beeinflusst werden (Bhattacharyya et al. 1997).

Lange Zeit war der Wirkmechanismus über den retrograden trophischen Signalfluss der einzige bekannte Weg von Neurotrophinen. In jüngerer Zeit wurde entdeckt, dass es auch einen anterograden trophischen Signalfluß gibt. So wurde im visuellen System des Hühnchens nachgewiesen, dass exogene Neurotrophine vom Zellkörper in Richtung Axonterminus transportiert werden. Bartheld und Mitarbeiter (von Bartheld et al. 1996). Präsynaptisch werden sie in intakter Form ausgeschüttet, und binden nach Diffundieren durch den synaptischen Spalt postsynaptisch an entsprechende *trk*-Rezeptoren. Des Weiteren wurde der anterograden Transport von BDNF (brain derived neurotrophic factor) in Spinalganglien bestätigt (Zhou und Rush 1996 a, b). Diese Ergebnisse legen nahe, dass anterograd transportierte Neurotrophine eine Rolle bei synaptischer Plastizität spielen. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass sie nach ihrer Freisetzung in den synaptischen Spalt mehr als nur eine einzelne Synapse beeinflussen (von Bartheld et al. 1996).

#### **4.2.1.2 Synaptische Plastizität nach Nervenläsion**

Wie oben gesagt, betrifft die Axotomie eines Neurons auch dessen präsynaptischen Neurone und seine Zielzelle. Letztere kann sowohl ein postsynaptisches Neuron als auch, wie im Falle des N. facialis, eine Muskelzelle sein. In der Regel degeneriert oder atrophiert die Zielzelle eines Neurons zeitversetzt nach Axotomie.

Das präsynaptische Neuron des lädierten Neuron hingegen ist insbesondere in Hinblick auf seine synaptischen Verbindungen betroffen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Verdichtungen in der postsynaptischen Membran lädierter Neurone verschwinden, bevor eine Abnahme der Anzahl synaptischer Endigungen (Boutons) des präsynaptischen Neurons erfolgt (Sumner 1975). Biochemische Experimente ergaben, dass die postsynaptische Verdichtung in Abhängigkeit von synaptischer Aktivität bemerkenswerten strukturellen Veränderungen unterliegt. Reduzierte

synaptische Aktivität mag Veränderungen postsynaptischer Strukturen herbeiführen, die in Folge den synaptischen Kontakt abschwächen (Ehlers 2003). Interessanterweise wird parallel zum Verlust von Synapsen auch die Expression von PSD-95, einem Protein welches in der postsynaptischen Verdichtung sitzt und in die Regulation synaptischer Plastizität und der Synaptogene involviert ist, herunterreguliert (Che et al. 2000). Diese Befunde weisen auf die Formbarkeit reifer Synapsen als Antwort auf periphere Nervenverletzung hin. Sie stimmen mit ultrastrukturellen Beobachtungen von axotomierten spinalen Motoneuronen der Katze (Chen 1978), sowie dem vagalen Nervensystem des Meerschweinchens (Engel und Kreutzberg 1988) überein.

Da die experimentelle Läsion im Fazialismodell relativ weit distal vom neuronalen Zellkörper und seinen synaptischen Kontakten erfolgt, muss ein die synaptische Loslösung initiiierendes Signal zunächst von der Stelle der Axonläsion aus bis zum neuronalen Zellsoma, und anschließend zu den präsynaptischen Kontaktstellen des afferenten Neurons gelangen. Dieser Prozess hängt von retrograden Signalen zwischen dem Ort der Läsion und dem Zellsoma ab, die eine genaue zeitliche und räumliche Information über die Natur und das Ausmaß des Axonschadens vermitteln müssen, um eine angemessene Antwort des Zellkörpers auf die Schädigung zu ermöglichen. Solche u.a. die Chromatolyse im neuronalen Soma auslösenden Signale, welche intrinsische Regenerations- und Reperaturprogramme aktivieren, wurden kürzlich beschrieben. Es wurde gezeigt, dass neben einem schnellen elektrophysiologischen auch ein durch Importin vermitteltes Signal erfolgt (Rishal und Fainzilber 2010). Importin gehört zur Klasse der Karyopherine, einem Proteintyp, der im Zytoplasma eukaryoter Zellen befindliche Proteinmoleküle in den Kern transportiert, indem er an eine spezielle Erkennungssequenz, das so genannte "nuclear localization signal" (NLS), bindet. Es ist unbekannt, ob Importine möglicherweise auch in die schnelle Hochregulierung der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) nach Nervenverletzung involviert sind. Dies ist von Interesse, da Stickstoffmonoxid (NO) als interzellulärer Botenstoff bekanntermaßen an der Synaptogenese beteiligt ist (Yu 2002, Sunico et al. 2005). Es konnte des Weiteren anhand pharmakologischer Manipulation der nNOS gezeigt werden, dass der präsynaptische "Rückzug" in Abwesenheit von NO unterbunden wird. Auch wurde demonstriert, dass die Hochregulierung von nNOS mit der postrationalen Modifikation solcher Elemente assoziiert war, die an den verletzten neuronalen Zellkörper angrenzten. Es wird spekuliert, dass die für das Fazialismodell gut dokumentierten Veränderungen in der Expression trophischer Faktoren resultieren (Moran und Graeber 2004, Sunico et al. 2005). Somit ist es gut möglich, dass NO auch in den Ablösungsprozess präsynaptischer Elemente von der postsynaptischen Membran involviert ist. Die Rolle von NO als



retrogradem, die synaptische Ablösung vermittelnden Botenstoff, passt in das Konzept solcher Studien, die seine Funktion bei der Modifikation synaptischer Effektivität bei der Langzeitpotenzierung (LTP) im Zusammenspiel mit anderen retrograden Signalmolekülen demonstrieren (Garthwaite 2008).

Die vorgestellten Befunde sprechen stark dafür, dass die synaptische Loslösung von Motoneuronen im Anschluss an periphere Nervenschädigung ein rein neuronaler Vorgang ist, der ohne aktive Beteiligung von Mikroglia abläuft (Perry und O'Connor 2010).

Es ist wichtig zu verstehen, dass die Synapsen während dieser pathologischen Reaktion nicht degenerieren, sondern Bestandteil eines intakten, gesunden präsynaptischen Neurons bleiben welches die Kapazität hat, funktionale Verbindungen wieder herzustellen, sobald das periphere Neuron regeneriert.

Die in dieser Arbeit zwischen dem 3. und dem 5. Tag auftretende Reduktion der Synaptophysin-IR lässt auf einen verminderten präsynaptischen Inhalt schließen und damit auf verminderte Aktivität mit folglich vermindertem synaptischer Effizienz. Die zeitgleich verminderte Immunreaktivität von Neuroligin 1 (NL1-IR) und Synaptophysin (Syn-IR) lässt auf eine verminderte Adhäsion exzitatorischer Synapsen schließen, die auch mit vermindertem synaptischer Effizienz einher geht. In der vorliegenden Arbeit wurden in den meisten untersuchten Tieren parallele Veränderungen der beiden Antigene gefunden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass das im folgenden Abschnitt vorgestellte „synaptic stripping“ der axotomierten Motoneurone offensichtlich mit dramatischer Abnahme der NL1-IR und Syn-IR im Nucleus facialis einhergeht. Eine hieraus zu schließende verminderte Expression von NL1 und Syn hat etwa den gleichen Zeitverlauf wie das beschriebene synaptic stripping. Es kann also keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Abnahme der Synapsenadhäsion oder Gliareaktion initial stattfindet.

#### **4.2.1.3 Synaptic stripping**

Es war das klassisch gewordene Fazialismodell, an dem Blinzinger und Kreutzberg erstmals 1968 neben der Reaktivität von Gliazellen die Loslösung synaptischer Verbindungen von somanahen Dendriten und Zellkörpern axotomierter, in Chromatolyse begriffener, Motoneurone beobachteten.

Die beiden Autoren fanden, dass spezifische Oberflächenänderungen der Membranen regenerierender Motoneurone innerhalb der ersten Woche nach Axotomie zu einer Loslösung synaptischer Kontakte führen. Des Weiteren beobachteten sie eine rasche Proliferation von Mikrogliazellen, die den neuronalen Zellkörper mit ihren Prozessen umwickelten, bzw. sich in den synaptischen Spalt "drängten". Diese Beobachtungen führten dazu, dass Mikrogliazellen eine aktive Beteiligung bei der Entfernung (bzw. Englisch: "stripping") der synaptischen Kontakte zugeschrieben wurde (Blinzinger und Kreutzberg 1968). Ähnliche Phänomene wurden für zahlreiche Systeme bestätigt (Cotman et al. 1981). Es wird davon ausgegangen, dass durch das "synaptic stripping" die Synapsenfunktion unterbunden, und so die Wiederherstellung der neuronalen Funktionsfähigkeit verhindert wird (Kandel et al. 2000). Axotomierte Motoneurone werden im weiteren Verlauf von Astrozytenfortsätzen umhüllt, so dass eine "Glianarbe", und durch die hierdurch entstandene Isolation ein Schutz für das verletzte, in Regeneration begriffene Neuron entsteht (Graeber und Kreutzberg 1990, Moran und Graeber 2004). Letztendlich sollen die beschriebenen Reaktionen von Mikroglia und Astrozyten innerhalb von beschädigten neuronalen Netzwerken auf diese Weise das axonales Wachstum fördern. Beobachtungen von ähnlichen, dementsprechend dem "synaptic stripping" zugeschriebenen Phänomenen, konnten nach Verletzung des Nervus hypoglossus sowie im Rahmen von Entzündungsreaktionen im Kortex gemacht werden (Svensson und Aldskogius 1993, Svensson et al. 1993, Trapp et al. 2007).

Inzwischen steht fest, dass das Fazialismodell keine ausreichenden Beweise dafür liefert, dass die Mikrogliazellen im Anschluss an eine Axotomie des N. facialis Phagozytoseaktivität im Fazialiskern ausüben oder synaptische Elemente auf andere Weise beseitigen (Hugh Perry und O'Connor 2010). Statt dessen scheint das Vordringen der feinen Mikrogliafortsätze zwischen die präsynaptischen Elemente und den neuronalen Zellkörper ein Vorgang zu sein, welcher die Lösung der synaptischen Verbindung nur begleitet, anstatt sie kausal zu verursachen. Um die Frage nach der aktiven Beteiligung von Mikroglia an der Entfernung synaptischer Kontakte von Motoneuronen zu untersuchen, wurde von verschiedenen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen Manipulationen an der Proliferation von Mikrogliazellen vorgenommen. Hierbei konnte eine Studie zeigen, dass eine Unterbindung der durch Hypoglossusaxotomie induzierten Proliferation von Mikroglia zu einer keinerlei Auswirkung auf die Loslösung von Synapsen vom Zellkörper des verletzten Motoneurons, und zum anderen keine Auswirkung auf die (trotzdem stattfindende) Regeneration seines peripheren Axons hatte (Svensson und Aldskogius 1993). Eine andere Studie zeigte an einem Mäusestamm ohne funktionsfähigem Makrophagen CSF-1 (colony stimulating factor-1), dass eine Lösung

synaptischer Kontakte nach peripherer Fazialisdurchtrennung auch ohne die Proliferation von Mikroglia erfolgte (Kalla et al. 2001).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Proliferation von Mikrogliazellen keine Voraussetzung für den Umbau oder für die Loslösung präsynaptischer Kontakte von verletzten Neuronen im adulten ZNS ist. Anders gesagt: Es spricht nichts dafür, dass pathologisch (durch Fazialisaxotomie) induzierte Synapsenplastizität in einem kausalen Zusammenhang mit der Proliferation von Mikroglia, etwa im Sinne eines "synaptic stripping", steht. Dennoch ist es interessant festzustellen, dass Mikrogliazellen auf synaptische Degeneration bekanntermaßen rasch mit einer erhöhten oder de novo Expression verschiedener Proteine, sowie mit Veränderung ihrer Morphologie reagieren (Rao und Lund 1993, Jensen et al. 1999). Es ist hierbei nicht bekannt, welche Signale degenerierender Synapsen zu einer Aktivierung der Mikroglia führen, wenngleich es diverse potentielle Kandidaten hierfür gibt, inklusive Neurotransmitter und niedrigmolekulare Mediatoren (Hanisch und Kettenmann 2007).

Die beschriebenen, mit synaptic stripping einher gehenden neuronalen und gliösen Reaktionen wurden ausführlich für den Nucleus facialis der Ratte beschrieben. Es wurde geschätzt, dass verletzte faziale Motoneurone nach Fazialisaxotomie ca. 80 % ihrer normalen synaptischen Kontakte verlieren (Blinzinger und Kreutzberg 1968).

So existieren zahlreiche experimentelle Daten über die Aktivierung von Astrozyten (Graeber und Kreutzberg 1986, Graeber und Kreutzberg 1988) Mikroglia (Streit et al. 1988) als die axonale Reaktion begleitende Prozesse. Im Gegensatz zu Mikrogliazellen erfolgt bei Astrozyten keine Mitose in Folge einer Axotomie des N. facialis (Graeber et al. 1988). Für den menschlichen Nucleus facialis wurde 1993 erstmals ein Fall von synaptic stripping beschrieben was darauf hinweist, dass periphere Fazialisläsion auch im Menschen langfristig zu synaptischer Deafferentierung führen kann (Graeber et al. 1993).

#### **4.2.1.4 Reaktion von Astrozyten auf Axotomie**

Es wurde gezeigt, dass ein durch Fazialisaxotomie gegebener peripherer neuronaler Stimulus die intrakraniellen Astrozyten in vivo beeinflussen kann obwohl es weder zu einer direkten mechanischen, noch zu einer über die Verletzung der Blut-Hirn-Schranke indirekten Manipulation

der Astroglia kommt.

Es wurde gezeigt, dass Astroglia im Nucleus facialis zu schnellen Reaktionen auf die Axotomie der fazialen Motoneurone fähig ist. Die bisher schnellste beschriebene gliale Reaktion auf Fazialisaxotomie, eine Erhöhung der Immunreaktivität des astrozytären Strukturproteins Connexin-43 (Cx-43), zeigten Rohlmann, Laskawi und Wolff (Rohlmann et al. 1994). Cx-43 ist das vorherrschende gap junction protein der Astrozyten. Eine verstärkte Cx-43-Immunreaktivität in Astrozyten wurde durch A. Rohlmann bereits 0,75-1.5 Std. nach Fazialisdurchtrennung detektiert, und auf astrogliale Kopplungsvorgänge zurück geführt (Rohlmann et al. 1993). Diese außerordentlich schnelle Veränderung auf glialer Ebene ist am ehesten als eine *reaktive* morphologische Veränderung zu interpretieren, da eine bereits nach 0,75 Std. entstehende de novo-Synthese aufgrund der entsprechenden physiologischen Gegebenheiten ausgeschlossen werden kann (Rohlmann et al. 1994). Fest steht nach Rohlmann, daß Astrozyten auf eine neuronale Störung sehr kurzfristig mit astroglialen Kopplungsvorgängen reagieren (Rohlmann et al. 1993, Rohlmann et al. 1994). Astrozyten im Nuc 7 reagieren auf Fazialisaxotomie außerdem mit einer Hochregulierung von GFAP. Hierbei handelt es sich um eine Komponente des für sie charakteristischen Zytoskeletts. Diese Reaktion konnte ca. 12 Stunden im Anschluß an Fazialisaxotomie, d.h. erst nach den oben beschriebenen Veränderungen auf neuronaler Ebene, gezeigt werden (Tetzlaff et al. 1988 a).

Im Gegensatz zu CX-43 und GFAP ist das in dieser Arbeit verwandte S100, wie oben erwähnt, kein rein astroglisches Antigen sondern färbt auch Neurone an. Die im Fazialiskern mit S100 angefärbten gliösen Strukturen, insbes. Astrozytenlamellen, sind zwar qualitativ gut lichtmikroskopisch detektierbar. Seitenunterschiede fanden sich jedoch nicht. Grund ist, dass die Architektur des Kortex eine Identifizierung der in Form von "wolkigen Färberealen" lokalisierbaren, aber in ihrer Struktur lichtmikroskopisch nur schwer auflösbaren Astrozytenlamellen eine Quantifizierung besser zulässt. Somit konnte auf der Grundlage unserer Befunde in Hinblick auf Gliareaktionen nach Fazialisaxotomie keine sichere Aussage über Seitenunterschiede im Fazialiskern gemacht werden.

#### **4.2.2 Lichtmikroskopische Veränderungen im Motorkortex nach Fazialisaxotomie**

In den letzten Jahren hat sich das allgemeine Verständnis des Motorkortex aufgrund neuer Erkenntnisse über die Art seiner funktionellen Veränderungen und über Modifikationen, die mit

Lernen und Kognition einhergehen, deutlich geändert. So scheint das Konzept, dass der primäre Motorkortex (MI) ein streng unterteilt organisierter, neuronaler "Bedienungsterminal" ist, von dem aus Körperbewegungen neuronal ausgeführt werden, unhaltbar. Statt dessen weist die aktuelle Datenlage darauf hin, dass der MI aus mehreren Modulen besteht, die jeweils für die Kontrolle eines Hauptsystems zuständig sind (Sanes und Donoghue 2000). Für den Menschen ist die Organisation des "Hauptsystems Arm" am besten erforscht. Eine Neuronenpopulation innerhalb des Armmoduls umfasst ein weit verteiltes neuronales Netzwerk, in dem jedes Neuron potentiell zu jeder Armbewegung beitragen kann. Das heißt, jedes den Arm kontrollierende Neuron des MI ist in eine Netzwerk lateraler oder horizontaler Verbindungen mit anderen kortikalen "Arm-Neuronen" eingebettet. Eine Eigenschaft kortikaler Pyramidenneurone ist ihre Projektion in mehrere Richtungen. Zusätzlich zu ihrem efferenten Axon haben sie ausgedehnte Kollateraläste (Ghosh und Porter 1988). Diese können in die unmittelbare und weiter entfernte Nachbarschaft projizieren. Diese typischen horizontalen Verbindungen können innerhalb des Motorkortex des Menschen bis zu 1 cm weit reichen (Keller 1993, Huntley und Jones 1991, DeFelipe et al. 1986). Folglich können die kortikalen Motoneurone neben ihrer Projektion in subkortikale ZNS-Ebenen auch an internen Prozessen des MI teilhaben. Dabei scheint es, dass die Einstellung der Balance von Erregung und Hemmung innerhalb des MI dessen Organisation verändern kann (Sanes und Donoghue 2000). Die hiermit verbundenen Vorgänge können eine differenzierte Architektur enthüllen, die wiederum unterstützend für Organisationsstrukturen ist. Zum einen können sich kortikale Netzwerkstrukturen in Abhängigkeit von kurzfristigen Bedürfnissen des Systems dynamisch an diese anpassen. Zum anderen unterliegen auch die Synapsen des MI Plastizität, was in Abhängigkeit ihrer Aktivität eine Rekonfiguration der neuronalen Netzwerkorganisation innerhalb der einzelnen Module über längere Zeiträume zulässt.

Es ist bekannt, dass eine periphere Durchtrennung des N. facialis zu Veränderungen im primären motorischen Kortex (MI) adulter Ratten führt. Es handelt sich bei diesen Vorgängen um Schritte, die letztlich zu einer Reorganisation der motorischen und sensorischen Repräsentationen, bzw. des "Rattunculus" führen. Bisher ist allerdings nicht sicher, auf welchem Weg die kortikalen Veränderungen induziert werden. Es war lange unklar, ob die zellulären und molekularen Mechanismen welche den Veränderungen im MI nach Fazialisaxotomie zugrunde liegen auf den MI beschränkt sind oder andere kortikale und subkortikale Regionen einschließen.

Bei der Diskussion der in dieser Arbeit im lichtmikroskopischen Hellfeld auffindbaren, mittels von drei verschiedenen Antikörpern gefundenen immunhistochemischen Färbearterchiede im Motorkortex (MI), ist grundsätzlich zu beachten, dass die durch Fazialisaxotomie bedingten pathophysiologischen Veränderungen im Kortex möglicherweise über zwei verschiedene Wege, den retrograden und den anterograden Weg verursacht sein können.

#### **4.2.2.1 Der retrograde Weg**

Der retrograde Weg betrifft den efferenten Schenkel. Er umfasst die den Neuronen des Nervus facialis direkt vorgeschalteten (präsynaptischen) Neurone. Lange Zeit wurde angenommen, dass die Kontrolle des Vibrissen-Motorkortex der Ratte (V-MI) über die Schnurrhaarbewegungen ausschließlich über indirekte Wege gesteuert wird. So beschrieben vorangehende anatomischen Studien überwiegend oligosynaptische Verbindungen vom V-MI zu fazialen Motoneuronen (Miyashita et al. 1994, Hattox et al. 2002). Die fazialen Motoneurone werden außerdem von Neuronen des Hirnstamms ("central pattern generator") sowie der trigeminalen sensorischen Schleife angesteuert (Hattox et al. 2002, 2003). Anatomische Entwicklungs- und vergleichende Studien von Menschen und Affen wiesen darauf hin, dass sich direkte Projektionen vom Motorkortex zum Rückenmark evolutionär entwickelten, um eine hochgradige Kontrolle über Kontraktionen orofazialer, Zungen- und Fingermuskeln zu ermöglichen (Kuypers 1982, Porter and Lemon 1995). In Bezug auf Nager wurde herausgefunden, dass diese mit einzelnen ihrer Schnurrhaare gerichtete Bewegungen durchführen können (Sachdev et al. 2002, 2003), sowie dass einzelne Schnurrhaarbewegungen durch intrakortikale Mikrostimulation evoziert werden können (Izraeli and Porter 1995, Brecht et al. 2004b). Dass der V-MI kortikonukleäre Neurone aufweist, welche direkt die Bewegungen der Schnurrhaare ansteuern können, konnte u.a. von Grinevich et al. (2005) nachgewiesen werden. Anhand von Injektionen mit GFP exprimierendem Lentivirus in Neurone des "Vibrissen-Motorkortex" konnten sie nachweisen, dass diese monosynaptisch verschaltet sind, also vom V-MI direkt zum Fazialiskern (Nuc 7) verlaufen (Grinevich u. a., 2005).

Wie zuvor beschrieben, werden die synaptische Verbindungen der dem axotomierten Fazialisnerven vorgeschalteten Neurone, also auch die kortikonukleären Neurone, von den Somata der Fazialisneurone abgelöst. Darüber, welche Effekte genau die Axotomie auf die vorgeschalteten

Neurone darüber hinaus hat, ist wenig bekannt. Fest steht, dass Neutrophin-Signale in Form internalisierter Neutrophin-Rezeptor-Komplexe retrograd vom distalen Axon zum Soma des präsynaptischen Neurons transportiert werden können (Zweifel u. a., 2005). Auf diesem Weg können, abhängig von Art und Zustand der Zielzelle, Wachstum, Überleben oder Genexpression im präsynaptischen Neuron herbeigeführt werden (Ehlers et al. 1995, Halegoua et al. 1991) Welche dieser möglichen Prozesse sich in den kortikonukleären Neuronen des V-MI abspielen, ist schwer zu bestimmen. Darüber, welche Effekte der Fazialisaxotomie den Motorkortex auf retrogradem Weg erreichen, kann somit nur spekuliert werden.

#### **4.2.2.2 Der anterograde Weg**

Sensible Informationen des Gesichts erreichen das ZNS über den N. Trigeminus. Da über diesen Weg letztlich auch die Informationen aus der fazialisinnervierten Vibrissenmuskulatur über den afferenten Schenkel in den Motorkortex (MI) gelangen, lässt er sich auch als anterograde Weg bezeichnen. Neben dem Tastsinn wird dem ZNS über ihn auch die "Reaktion" des Sensors auf die übermittelten motorischen Befehle zugeleitet. Diese spezifische Antwort auf die motorische Efferenz wird Reafferenz genannt. Im ZNS wird diese Reafferenz mit der so genannten Efferenzkopie verrechnet, wobei die Efferenzkopie eine intrakortikal verbleibende Kopie des vom MI an die Peripherie geleiteten motorischen Befehls ist. Sie wird mit dem sensorischen feedback des durch die motorische Aktivität betroffenen Sensors, eben der Reafferenz, verglichen. Für die Afferenzen, und insofern auch für die Reafferenz der mimischen Muskulatur, ist sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte der N. trigeminus verantwortlich. Verbindungen zwischen dem N. trigeminus und dem N. facialis sind für den Menschen gut erforscht (Nordin und Hagbarth 1989, Baumel 1974).

Für den Tastsinn der Ratte haben die motorisch durch den N. facialis versorgten Schnurrhaare eine grundlegende Funktion. Wie die meisten Nager können Ratten sich anhand ihrer Schnurrhaare ihre Umgebung erschließen, wobei sie komplexe Orientierungs- und Diskriminierungstasks durchführen (Hutson and Masterton 1986, Guió-Robles et al. 1989, Brecht et al. 1997, Diamond et al. 2008). Die mittels der Vibrissen ermittelten, sensorischen Informationen werden über den so genannten "whisker-to-barrel-pathway" weitergeleitet und auf dem Weg vom Nucleus trigeminus (Nuc 5) bis zum primären somatosensorischen Kortex (SI) verarbeitet. Dieser "whisker-to-barrel pathway" ist

heute sehr gut charakterisiert (Waite 2004, Petersen 2007, Schubert et al. 2007). Er weist auf allen Stationen der Prozessierung (Hirnstamm, Thalamus und SI) somatotope Karten der Rezeptorperipherie auf, welche jeweils aus einzelnen Modulen bestehen. Diese Module sind auf Hirnstammebene die so genannten "barrelles" im Nucleus Trigemini (Belford and Killackey 1979, Ma 1991); im Zwischenhirn die so genannten "barreloids" (Van der Loos 1976) im Nucleus ventralis posteromedialis thalami (VPM); sowie kortikal die "barrels" im somatosensorischen Kortex (SI) (Woolsey and Van der Loos 1970). Jeder "barrel" repräsentiert strukturell und funktionell ein kontralaterales Schnurrhaar und dessen individuelle Rezeptoranordnung (Welker 1971, Simons 1978). Aufgrund zahlreicher intrakortikaler Verbindungen zwischen SI und MI (Asanuma et al. 1968, Ivy und Killackey 1982, Sievert und Neafsey 1986, Zarzecki 1991, Miyashita et al. 1994) ist eine veränderte sensorische Afferenz potentiell in der Lage, eine Reorganisation motorischer Repräsentationen auszulösen (Iriki et al. 1989, 1991). Diese intrakortikalen Verbindungen besitzen auch eine somatotope Zuordnung, so dass die sensorische Afferenz einer Vibrisse in die entsprechende motorische Repräsentation derselben Vibrisse weitergeleitet wird (Izraeli und Porter 1995).

Da das sensorische Feedback des Rattengesichts durch den N. trigeminus geleistet wird, bleibt es physiologisch bei peripherer Fazialisaffektion intakt. Nach Fazialisaxotomie ist der anterograde Schenkel, der whisker-to-barrel-pathway, aber indirekt durch den Ausfall der motorischen Versorgung der Vibrissenmuskeln betroffen. Das heißt, dass sich der durch Lähmung der Vibrissenmuskeln bedingte veränderte sensorische Vibrissen-Input nach Verarbeitung seiner Information auf dem Weg vom Nervus trigeminus zum primären Motorkortex letztlich auf diesen auswirken muss.

#### **4.2.2.3 Neuronale Veränderungen im Motorkortex (MI) nach Fazialisaxotomie**

Veränderungen kortikaler Repräsentationsmuster im Motorkortex (MI) als Folge peripherer Nervenläsion wurden erstmals von der Gruppe um Sanes und Donoghue beschrieben (Sanes et al. 1988). Mittels intrakortikaler elektrischer Stimulationen erstellte die Gruppe Karten kortikaler Somatotopie, die die funktionale Verbindung von Motorkortex und somatischer Muskulatur widerspiegeln. Dabei erfolgte ein Vergleich der somatotopen Karten normaler Ratten mit denen solcher Tiere, die zuvor einer Fazialisnervläsion unterzogen wurden. Es zeigte sich, dass sich die



Repräsentationen der vorderen Gliedmaße, des Auges und des Augenlids nach Fazialisläsion in das Vibrissenfeld ausweitete. Mittels einer dauerhaft im Motorkortex angebrachten Elektrode konnte innerhalb weniger Stunden nach Fazialisläsion eine Ausdehnung der Repräsentation der vorderen Gliedmaße in die Vibrissenregion gezeigt werden.

Anhand weiterer neurophysiologischer Studien derselben Gruppe konnte demonstriert werden, dass sich somatotopie Repräsentationskarten im MI adulter Ratten innerhalb von Stunden nach Fazialisaxotomie verändern (Donoghue et al. 1990, Sanes et al. 1990) Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass synaptische Verbindungen zwischen Motorkortex und somatischer Muskulatur in erwachsenen Säugetieren kontinuierlich neu geformt werden.

Toldi et al. 1996 fanden Hinweise dafür, dass sich durch Fazialisaxotomie bedingte Veränderungen in der kontralateral zur Läsion gelegenen Kortexhemisphäre in mehr als einer Phase entwickeln, und sich während der zweiten Woche postläsional stabilisieren (Toldi et al. 1996). Die Gruppe konnte zeigen, dass sich mittels elektrophysiologischer Stimulation des MI anästhesierter Ratten innerhalb von 4 Minuten nach Fazialisläsion ipsilaterale Vibrissenbewegungen induzieren ließen, wohingegen kontralaterale Vibrissenbewegungen ausblieben. In intakten Tieren waren die Muskelantworten auf kortikale Stimulation hingegen auf die kontralaterale Seite beschränkt. Als mögliche Erklärung für die postoperative Induktion solch schneller Veränderungen wurde eine Dishinhibition interhemisphärischer Verbindungen zwischen homotopen Repräsentationsfeldern im MI angenommen (Toldi et al. 1996). Als Ursache für diese kortikale Reaktion wurde von einem veränderten somatosensorischen Input aus den durch den N. facialis versorgten peripheren Gebieten ausgegangen. Um diese Annahme zu testen, wurde in einer anderen Arbeit der gleichen Gruppe während der einseitigen elektrischen Stimulation trigeminaler Afferenzen des Whisker-Pads die neuronale Aktivität des kontralateralen MI abgeleitet (Farkas et al. 1999). Ungefähr ein Drittel aller abgeleiteten MI - Neurone antwortete mit einer Latenz, die kürzer war als die des ventrolateralen und posterioren Thalamuskerns. Nach Eliminierung oder Inaktivierung des somatosensorischen Kortex (SI) schlugen die neuronalen Antworten fehl. Die aktivierbaren Neurone zeigten innerhalb des MI eine bilaminäre Verteilung (Lamina II/III und V) und konnten mittels Neurobiotinfärbung als Pyramidenzellen identifiziert werden. Dies Resultat spricht dafür, dass trigeminale Afferenzen über assoziative Verbindungen zwischen SI und MI an der Modulation der Aktivität von Output-Neuronen des MI teilhaben. In einer weiteren Arbeit der Gruppe wurden Effekte beidseitiger Vibrissenstimulierung auf den Motorkortex nach einseitiger Fazialisaxotomie untersucht. Auch in

dieser Arbeit kamen die Autoren zu dem Resultat, dass die kortikalen Reaktionen auf Axotomie durch vormals existierende, assoziative und kommissurale Verbindungen zurückzuführen sind, die durch die Fazialisdurchtrennung "demaskiert" wurden (Toldi et al. 1999).

Die Theorie, dass neuronale Verbindungen im Motorkortex (MI) funktionell "maskiert" bereits vorliegen und durch periphere Nervenläsion aktiviert werden, ist nicht neu. Verschiedene Arbeiten fanden, dass eine "Demaskierung" kortiko-kortikaler kommissuraler Verbindungen homotoper Gebieten beider Kortexhemisphären des MI aktiviert werden kann (Ivy und Killackey 1982) (Záborszky und Wolff 1982, Donoghue und Parham 1983). Heute ist bekannt, dass dynamische Verschaltungen des MI eine Schlüsselfunktion bei der Reorganisation kortikaler Karten haben. Das Plastizität ermöglichende intrinsische Substrat des MI ist ein System horizontaler neuronaler Verbindungen, das sich über den MI erstreckt. Es kann Neurone des MI funktionell so miteinander assoziieren, dass Nervenzellverbände aktiviert werden, welche dann als Grundlage neuer motorischer Karten fungieren (Sanes und Donoghue 2000). Die Existenz solch verborgener, horizontaler Verbindungen des MI konnte mit Hilfe fokaler und lokaler Blockaden GABAerger Hemmungen aufgewiesen werden. Diese bereits angelegten, nun demaskierten Verbindungen werden normalerweise vermutlich durch feed-forward-Inhibition blockiert. Eine Studie zeigte, dass eine lokale GABA-Freisetzung ähnliche Änderungen kortikaler Repräsentationen zur Folge hatte wie periphere Nervenläsionen (Jacobs und Donoghue 1991). Daraus lässt sich schließen, dass die erwähnte Demaskierung vorbestehender Nervenzellverbände im MI die kortikale Reorganisation mit ermöglichen. Diese Befunde wurden u.a. durch eine Studie gestützt, die die Mechanismen von durch Deafferentierung induzierter Plastizität im menschlichen Motorkortex anhand transkranieller Magnetstimulation untersuchte (Ziemann et al. 1998). Eine an die Ergebnisse dieser Arbeiten anknüpfende Überlegung ist, dass Feinheiten bei der Organisation des Motorkortex höchstwahrscheinlich jederzeit von einer präzisen Balance exzitatorischer und inhibitorischer Einflüsse innerhalb des Netzwerks der kortikalen Verbindungen (des MI) abhängen.

Im primären somatosensorischen Kortex (SI) wurde eine ähnliche Reorganisation kortikaler Repräsentationen wie im MI beobachtet. Nach Denervierung einer oder mehrerer Zehen der hinteren Gliedmaße der Ratte traten solche Reorganisationsprozesse innerhalb von fünf Minuten ein (Byrne und Calford 1991, Calford und Tweedale 1990, Calford und Tweedale 1991b, Calford und Tweedale 1991a). Aufgrund der ähnlichen Latenz bis zum Auftreten der kortikalen Reorganisationsvorgänge kann vermutet werden, dass im somatosensorischen und im motorischen

System ähnliche physiologische Mechanismen an der beginnenden Reorganisation kortikaler Repräsentationen nach Deafferentierung bzw. Deafferentierung beteiligt sind. Calford und Tweedale (1991 a, b) erklärten die raschen neuronalen Veränderungen nach Denervierung mit einer Disinhibition innerhalb des somatosensorischen Kortex, die normalerweise durch hemmende, GABAerge Interneurone verhindert wird. Bereits länger bekannt ist, dass GABAerge Interneurone entscheidend an der Ausbildung und Form von rezeptiven Feldern beteiligt sind (Sillito 1975), (Hicks und Dykes 1983, Dykes et al. 1984, Calford und Tweedale, 1991a, Calford und Tweedale 1991b, Calford und Tweedale 1991c). Es wird vermutet, dass exzitatorische Neurone auf die GABAergen Interneurone einwirken, deren Aktivität durch die Denervierung wegfällt (Calford und Tweedale 1991c). Diese Veränderung auf Seiten des SI könnte wiederum, über die bereits erwähnten, präzise topisch zugeordneten intrakortikalen Verbindungen, im primärem Motorkortex MI zu Veränderungen führen. Insbesondere eine Abstimmung der veränderten kortikalen Repräsentation zwischen beiden kortikalen Arealen wäre hierdurch verständlich.

Dies widerspricht zwar nicht der These einer retrograd bedingten Veränderung in MI. Es zeigt aber, dass in der Interpretation der experimentellen Befunde, das heißt der Interpretation der Verteilungsmuster der verschiedenen immunhistochemischen Färbungen der gewonnenen anatomischen Präparate, immer beide Signalwege beachtet werden müssen.

#### **4.2.2.4 Durch Fazialisaxotomie induzierte Veränderungen auf glöser Ebene**

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Laskawi et al. (1997) gaben Anhalt dafür, dass Astroglia in Hirnarealen mit Veränderungen in der Ausbildung von Connexin-43 da reagiert, wo synaptische Reorganisation stattfindet (Laskawi et al. 1997). Die Autoren nutzten das (auch in der vorliegenden Arbeit verwandte) Fazialismodell, um im Motorkortex von Ratten immunhistochemische Reaktionen verschiedener Astrozytenmarker nach Fazialisaxotomie nachzuweisen. Neben dem in dieser Arbeit ebenfalls verwendeten Gliamarker S100 konnten Veränderungen für GFAP- und für Connexin-43-Antikörper nachgewiesen werden. GFAP ist ein spezifisches Zytoskelettprotein reifer Astrozyten. Da es Astrozytenprozessen strukturelle Stabilität verleiht, wird es als grundlegend für die Beweglichkeit und Form der Astrozyten verantwortliches Protein verstanden. Die charakteristischerweise im Säuger-ZNS nach Verletzung erfolgende Astrogliosis wird von einer schnellen GFAP-Synthese begleitet. Somit kann GFAP als Indikator für

Veränderungen des Zytoskeletts von Astrozyten verwendet werden (Eng et al. 2000), (Graeber und Kreutzberg 1988), (Missler et al. 1994). Connexin 43 (CX-43) ist ein charakteristischer Marker astrozytärer gap junctions (Dermietzel et al. 1990).

Als Kontrolltiere verwendeten Laskawi et al. "scheinoperierte" Ratten. An diesen Tieren wurden bis auf die Fazialisdurchtrennung sämtliche beim Fazialismodell üblicherweise angewandten Operationsschritte vollzogen. In den Kontrolltieren wurde zu verschiedenen Überlebenszeiten im gesamten Kortex S-100 Immunreaktivität nachgewiesen, die durchgehend auf Lamina I/II begrenzt blieb, wohingegen die Immunreaktivität in tiefer liegenden kortikalen Laminae niedrig war. Bei den Versuchstieren bildete sich nach Durchtrennung des N. facialis innerhalb der ersten Stunde ein charakteristisches Verteilungsmuster erhöhter S100-IR innerhalb beider Kortexhälften aus, das sich in Abhängigkeit von der Überlebenszeit veränderte. Dabei waren die Veränderungen auf der zur Läsion kontralateralen Kortexseite prominenter. Im Gegensatz zu den scheinoperierten Tieren war die S-100-IR nicht auf die Laminae I/II begrenzt, sondern erschien in tiefer gelegenen kortikalen Laminae (III-VI). Betroffen waren nicht nur die dem N. facialis korrespondierenden kortikalen Regionen, sondern auch benachbarte kortikale Areale. 24 Stunden nach Fazialisdurchtrennung waren die Gebiete erhöhter S-100-IR auf das Repräsentationsareal des N. facialis der kontralateral gelegenen Kortexhemisphäre begrenzt. Streifen vermehrter Connexin-43-IR waren nach kurzen Überlebenszeiten (ca. 3 Stunden) in Regionen zu finden, die mit denjenigen erhöhter S-100-IR identisch waren. Veränderungen der GFAP-Immunreaktivität erschienen erst in späteren Phasen nach 24 Stunden postläsional. Es wurden auch ausschließliche Läsionen des N. trigeminus gesetzt. Dies verursachte keine reproduzierbaren astroglösen Veränderungen. Eine kombinierte Läsion des N. trigeminus und des N. facialis hingegen machte Reaktionsmuster sichtbar, die verglichen zur alleinigen Fazialisnervläsion modifiziert waren.

Eine weitere Arbeit in der Änderungen in der S100-Immunreaktivität im Kortex von Ratten nach Fazialisläsion beobachtet wurde, stammt von M. Landgrebe (2000). Die hier gemachten Beobachtungen ergaben, dass Zonen erhöhter S100-IR innerhalb einer Stunde nach Fazialisläsion in beiden Hemisphären auftraten (Landgrebe et al. 2000). Zwischen 3,5 und 18 Stunden postläsional wurden Reaktionsmuster wechselnder Topographie beobachtet, die in verschiedenen kortikalen Areale (einschließlich Teilen des MI) auftraten, welche an die Region der fazialen Muskelrepräsentation grenzten. Nach 24 Stunden färbte sich der Bereich der kontralateral zum axotomierten N. facialis gelegenen Muskelrepräsentation an, wohingegen die S100-IR im übrigen

Kortex weitgehend verschwand. Am zweiten Tag nach Fazialisläsion verschwand die S100-IR vollständig. Die Autoren schlussfolgerten zum einen, dass eine erhöhte S100-IR in denjenigen kortikalen Bereichen kennzeichnet, die von funktionalen Reorganisationsvorgängen nach Fazialisaxotomie betroffen sind. Zum anderen vermuteten sie, dass große Teile des Zerebralkortex an den Reorganisationsvorgängen beteiligt sind, bevor diese sich letztendlich auf das Repräsentationsareal des MI beschränken, das mit dem kontralateralen Fazialisbereich korrespondiert.

Die Ergebnisse der bisher vorgestellten Arbeiten zeigen, dass die durch Fazialisaxotomie verursachten kortikalen Reorganisationsprozesse beide Kortexhälften betreffen. Des Weiteren legen insbesondere die Arbeiten von Laskawi und Landgrebe die Vermutung nahe, dass Astrozyten bei den kortikalen Reorganisationsvorgängen eine entscheidende Rolle spielen. Beides konnte durch die experimentellen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Anhand der gefundenen Muster erhöhter S100-IR nach Fazialisläsion zeigt sich, dass während kortikaler Reorganisationsvorgänge astrozytäre Reaktionen stattfinden. Dass Laskawi und Landgrebe in ihren Versuchen scheinoperierte Tiere zum Vergleich mit wirklich operierten Tieren heranzogen, deutet auf Schwierigkeiten beim Vergleich von operierten mit gänzlich unbehandelten Kontrolltieren hin. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten operierten und Kontrolltieren konnten wir einen reaktiven und einen vermutlich nicht reaktiven Zustand entdecken.

Dass die S100-Färbung, wie von Landgrebe et al. beschrieben, 24 Stunden nach Fazialisaxotomie abnahm, lässt sich durch unsere Befunde nicht bestätigen, da 3, 5 und 10 Tage postoperativ ebenfalls eine erhöhte S100-IR zu beobachten war. Ebenso konnte der vorherige zeitliche Verlauf der S100-Immunfärbungen nicht nachvollzogen werden, wobei in dieser Arbeit nur die Überlebenszeit 4 und 24 Stunden betrachtet wurden, und nicht wie bei Landgrebe et al., verschiedene Überlebenszeiten von 1 bis 24 Stunden. Wenngleich die von uns beobachteten Muster kortikaler S100-IR denen der in diesem Labor entstandenen Vorarbeiten sehr ähnlich waren, konnten aus unserem Versuchsmaterial keine zeitlich regelhaften Abfolgen der Immunfärbungen abgeleitet werden. Mit anderen Worten konnte die starke Regelmäßigkeit des Färbeverhaltens innerhalb eines Antikörpers bei den verschiedenen von Landgrebe beschriebenen Überlebenszeiten nicht bestätigt werden. Zwar ist hierbei zu berücksichtigen, dass wir pro Überlebenszeit eine relativ geringe Anzahl von Tieren verwendeten (2-4). Die interindividuellen Unterschiede waren allerdings so groß, dass höchstwahrscheinlich eine ebenso große Streuung vorhanden gewesen wäre, hätten

wir mehr als 4 Tiere pro Überlebenszeit verwendet.

Die vielen interindividuelle Schwankungen waren bei den Tieren dieser Arbeit nicht auf den MI, und auch nicht auf den "barrel cortex" des primären somatosensorischen Kortex (SI) beschränkt. Die Quintessenz unserer Tabelle besagt, dass wir, verglichen mit anderen kortikalen Bereichen, die ausgeprägtesten Veränderungen der Immunfärbungen im MI gefunden haben. Dies wirft die Frage auf, wie die Veränderungen vermittelt sind. Wie weiter oben gezeigt wurde, ist der retrograde Weg über kortikonukleäre Fasern aufgrund der Langsamkeit des retrograden Transports von z.B. Neutrophinen unwahrscheinlich, so dass davon auszugehen ist, dass die Veränderungen des peripher durch den N. facialis versorgten Gebiets anterograd über den afferenten Schenkel (also den "whisker-to-barrel-pathway") vermittelt werden. Die Betrachtung der Veränderungen im primären Motorkortex MI lässt im Rahmen der hier vorgenommenen experimentellen Anordnung keine vollkommen sichere Unterscheidung zwischen diesen beiden unterschiedlichen Wege zu. Somit kann letztlich nicht festgelegt werden, welche der theoretisch möglichen subkortikalen und kortikalen anatomischen Strukturen, einschließlich Thalamus und den sekundären somatosensorischen Kortex (SII), die durch Fazialisaxotomie bedingten Veränderungen im MI verursachen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die beobachteten Veränderungen, wenn auch interindividuell variabel, neben dem MI auch im somatosensorischen Kortex (SI und SII) und im angrenzenden sekundär motorischen Kortex (M2) gefunden wurden. Diese Befunde sprechen für anterograd vermittelte Reaktionen und scheinen daher mit den neurophysiologischen Befunden von Sanes und Donoghue konform zu gehen.

Es gibt Hinweise dafür, dass bereits bestehende synaptische Kontakte dadurch von einem ineffektiven in einen affektiven Status versetzt werden, dass GABAerge Hemmung im Kortex herunterreguliert wird. Es ist schon länger bekannt, dass Gliazellen wichtige Funktionen bei der Regulation GABAerger Vorgänge haben. So exprimieren sie funktionale metabotrope und ionotrope GABA-Rezeptoren (Vélez-Fort et al. 2011). Neuronale Signalmechanismen, welche an der Aktivierung dieser Rezeptoren beteiligt sind, sind vermutlich ähnlich komplex wie diejenigen der Neurone untereinander. Astrozyten können, vermutlich über nicht-vesikuläre Mechanismen, GABA freisetzen und hierdurch Signale an Neuronen übermitteln. Die genaue Rolle der GABAergen Signale beim Zusammenspiel von Neuronen und Glia ist noch lange nicht enträtselt, dennoch wurde vermutet, dass die Aktivierung von Gliazellen durch GABA bedeutender Hirnfunktionen wie neuronale Aktivität, Differenzierung, Myelinierung und Neuroprotektion beeinflusst (Vélez-Fort et

al. 2011). Die molekularen Mechanismen, nach denen Astrozyten auf neuronale Aktivitätsänderungen reagieren, sind grundsätzlich unbekannt. Wenn aber Demaskierung durch Disinhibition bei der Kompensation eine Rolle spielt, so können Astrozyten durchaus in der Lage sein, freigesetztes GABA zu beeinflussen. Astrozyten sind aktive Elemente der "tripartite synapse", sie beseitigen den Hauptanteil der aus dem synaptischen Spalt ausgeschütteten Neurotransmitter. Neurotransmitter uptake der durch Astrozyten bewirkt wird, trägt zur Stärke und der zeitlichen Regulierung von synaptischem Input bei. Eine Studie, welche die Funktion von Astrozyten an kortikostriären synaptischen Verbindungen untersuchte konnte zeigen, dass die Aufnahme von Neurotransmitter durch Astrozyten eine Schlüsselfunktion bei kortikostriären Informationsprozessen hat (Goubard et al. 2011). Eine weitere Studie zeigte die Funktion eines astrozytären GABA-Transporters als eine Art Schrankenwärter ("gate-keeper") auf (Beenhakker und Huguenard 2010). Diese Funktion ist so zu verstehen, dass die astrozytäre Aufnahme von GABA deren Diffusion von Synapsen zu den extrasynaptischen Regionen verhindert, die potentiell vermehrt GABA(B)-Rezeptoren exprimieren könnten.

Auch bei der strukturellen Umorganisation in einem Hirngebiet können Astrozyten teilnehmen. Hinweise auf vermehrte Reorganisation von Synapsen in Form lysosomaler Degradation präsynaptischer Komponenten (Wolff et al. 1995) wurden in kortikalen Arealen gefunden, in denen sich auch erhöhte S100-IR fand (Laskawi et al. 1996).

#### **4.2.2.5 Neuroligin1/Synaptophysin-Immunreaktivität im Motorkortex**

Das in verschiedenen kortikalen Bereichen beobachtete parallele Auftreten erhöhter Immunreaktivität von Synaptophysin und Neuroligin 1 legt nahe, dass in Arealen erhöhter neuronaler Aktivität auch die Synapsenadhäsion verstärkt ist.

Reduzierte Synaptophysin-IR lässt auf einen verminderten präsynaptischen Inhalt schließen und damit auf verminderte synaptische Effizienz.

Verminderte NL-IR läßt auf verminderte Adhäsion exzitatorischer Synapsen mit möglicherweise dem gleichen Effekt schließen. In den vorliegenden Arbeit wurden in den meisten untersuchten Tieren parallele Veränderungen beider Antigene im Nucleus facialis gefunden, wo der Abbau von Motoneuronen mit anderen Methoden bereits beschrieben wurde. Wir fanden auch eine parallele Abnahme der beiden Antigene im Kortex und hier besonders im Motorkortex. Mit Sicherheit kann

man hier nicht von verminderter neuronaler Aktivität ausgehen, aber wahrscheinlich ist ein verminderter Transmittergehalt präsynaptischer Vesikel. Auch wenn unsere Ergebnisse nur das Vorhandensein von NL1 und Syn, nicht aber deren Funktionsfähigkeit zeigen, ist diese Interpretation auch vor dem Hintergrund bereits bekannter Befunde zu zentralen Reorganisationsprozessen bei peripheren Nervenläsionen erlaubt.

Ein reziproke Färbeverhalten von NL1 und Syn mit S100 fand sich an verschiedenen Lokalisationen des Kortex auch in Kontrolltieren, somit scheint es sich um einen allgemeinen Vorgang zu handeln. Es scheint sich um eine Überlagerung von physiologischen Vorgängen und der Reaktion auf die Fazialisdurchtrennung zu handeln.

Die Tatsache, dass sich zu gleichen Überlebenszeiten große interindividuelle Unterschiede fanden, kann vielerlei Ursachen haben. Jüngste Forschungsergebnisse zeigten, dass die Entstehung von Willkürbewegungen im MI eher auf weit verzweigten neuronalen Netzwerken beruht, als auf scharf abgegrenzten Arealen motorischer Repräsentationen (Sanes und Donoghue 1997). Diese Netzwerke unterliegen in erwachsenen Säugetieren einer ständigen Modifikation, wie anhand neuronaler Ableitungen und anhand durch bildgebende Verfahren dargestellte Aktivierungsmuster festgestellt werden konnte. Die intrinsischen horizontalen Nervenverbindungen die große Regionen des MI verbinden, zeigen aktivitätsabhängige Plastizität und können in Assoziation mit dem Erlernen neuer Fähigkeiten modifiziert werden (Sanes und Donoghue 2000). Es ist naheliegend, dass solche Lernprozesse große interindividuelle Unterschiede aufweisen, was sich folglich auch in einer interindividuell verschiedenen Rekrutierung kortikaler Netzwerkmodule auswirken muß. Unter anderem schloss Franchi aus seinen Ergebnissen, dass nach peripherer Nervendurchtrennung ablaufende funktionale Modifikationen innerhalb der Vibrissenregion des Motorkortex nicht homogen sind (Franchi 2002).



## 5 Zusammenfassung

Zusammenfassend erlauben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen Einblick in Reorganisationsprozesse zentralnervöser Nervenzellverbände im Kortex nach peripherer Fazialisaxotomie in der Ratte. Insbesondere ermöglichen die immunhistochemischen Ergebnisse der Arbeit ein erweitertes Verständnis des dynamischen Zusammenspiels von Synapsen, Synapsenadhäsion und Astroglia im Rahmen solchen Reorganisationsgeschehens.

Der immunhistochemische Nachweis einer synchronen, verstärkten Expression des Synapsenadhäsionsmoleküls Neuroligin 1 und des Vesikelmoleküls Synaptophysin nach Fazialisdurchtrennung in der Ratte kann als Hinweis für eine erhöhte Synapsenaktivität bzw. Synapsenadhäsion in den betreffenden Nervenzellverbänden interpretiert werden.

Das beobachtete reziproke Färbeverhalten von Neuroligin 1 sowie Synaptophysin gegenüber S100 lässt vor dem Hintergrund vorbestehender Erkenntnisse darauf schließen, dass eine verminderte Synapsenadhäsion in kortikalen Nervenzellverbänden mit einer Reaktion der Astroglia einhergeht. Hierbei ist auf der Basis unserer Ergebnisse anzunehmen, dass keine Mengenzunahme an S100 stattfindet, sondern dass Astrozyten während dieser Reaktion ihre Morphologie verändern. Es ist durchaus denkbar, dass S100 methodisch bedingt in einer geschwollenen Astrozytenlamelle zu mehr Immunreaktivität führt als in einer typischerweise nur 60 nm dicken Lamelle.

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse stützen die Erkenntnis, dass der Motorkortex (MI) in Hinblick auf seine Motorkontrollfunktionen keine statische Struktur ist, sondern in Form weit verzweigter neuronaler Netzwerke dynamische Strukturen enthält, die an motorischem Lernen und vielleicht auch an kognitiven Prozessen beteiligt sind.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams JC (1981): Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. *J Histochem Cytochem* 29, 775
- Allard T, Clark SA, Jenkins WM, Merzenich MM (1991): Reorganization of somatosensory area 3b representations in adult owl monkeys after digital syndactyly. *J Neurophysiol* 66, 1048-1058
- Alloway KD, Burton H (1991): Differential effects of GABA and Bicuculline on rapidly- and slow-adapting neurons in primary somatosensory cortex of primates. *Exp Brain Res* 85, 598-610
- Araque A (2008): Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol* 4, 3-10
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001): Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* 63, 795-813
- Armstrong-James M, Diamond ME, Ebner FF (1994): An innocuous bias in whisker use in adult rats modifies receptive fields of barrel cortex neurons. *J Neurosci* 14, 6978-6991
- Asanuma H, Larsen KD, Zarzecki P (1979): Peripheral input pathways projecting to the motor cortex in the cat. *Brain Res* 172, 197-208
- Aslan A, Goktan C, Okumus M, Tarhan S, Unlu H (2001): Morphometric analysis of anatomical relationships of the facial nerve for mastoid surgery. *J Laryngol Otol* 115, 447-449
- Banfai P (1976): [Applied anatomy of the facial nerve. I. Nuclei, supranuclear connections and peripheral nerve]. *HNO* 24, 253-264
- Barras FM, Pasche P, Bouche N, Aebischer P, Zurn AD (2002): Glial cell line-derived neurotrophic factor released by synthetic guidance channels promotes facial nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Res* 70, 746-755
- von Bartheld CS, Byers MR, Williams R, Bothwell M (1996): Anterograde transport of neurotrophins and axodendritic transfer in the developing visual system. *Nature* 379, 830-833
- Baumel JJ (1974): Trigeminal-facial nerve communications. Their function in facial muscle innervation and reinnervation. *Arch Otolaryngol* 99, 34-44 {Citation}

- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC (2002): Control of synaptic strength by glial TNF $\alpha$ . *Science* 295, 2282-2285
- Becher A, Drenckhahn A, Pahner I, Margittai M, Jahn R, Ahnert-Hilger G (1999): The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J Neurosci* 19, 1922-1931
- Beenhakker MP, Huguenard JR (2010): Astrocytes as gatekeepers of GABAB receptor function. *J Neurosci* 30, 15262-15276
- Belford GR, Killackey HP (1979): Vibrissae representation in subcortical trigeminal centers of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 183, 305-321
- Berg RW, Kleinfeld D (2003a): Vibrissa movement elicited by rhythmic electrical microstimulation to motor cortex in the aroused rat mimics exploratory whisking. *J Neurophysiol* 90, 2950-2963
- Berg RW, Kleinfeld D (2003b): Rhythmic whisking by rat: retraction as well as protraction of the vibrissae is under active muscular control. *J Neurophysiol* 89, 104-117
- Bhattacharyya A, Watson FL, Bradlee TA, Pomeroy SL, Stiles CD, Segal RA (1997): Trk receptors function as rapid retrograde signal carriers in the adult nervous system. *J Neurosci* 17, 7007-7016
- Blinzinger K, Kreutzberg G (1968): Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 85, 145-157
- Brecht M (2004): What makes whiskers shake? Focus on “current flow in vibrissa motor cortex can phase-lock with exploratory rhythmic whisking in rat”. *J Neurophysiol* 92, 1265–1266
- Brecht M, Preilowski B, Merzenich MM (1997): Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behav Brain Res* 84, 81-97
- Brecht M, Schneider M, Sakmann B, and Margrie TW (2004a): Whisker movements evoked by stimulation of single pyramidal cells in rat motor cortex. *Nature* 427, 704-710
- Brecht M, Krauss A, Muhammad S, Sinai-Esfahani L, Bellanca S, Margrie TW (2004b): Organization of rat vibrissa motor cortex and adjacent areas according to cytoarchitectonics, microstimulation, and intracellular stimulation of identified cells. *J Comp Neurol* 479, 360-373
- Brodal P: *The central nervous system*. Oxford University Press, New York 1992

Brose N (1999): Synaptic cell adhesion proteins and synaptogenesis in the mammalian central nervous system. *Naturwissenschaften* 86, 516-524

Byrne JA, Calford MB (1991): Short-term expansion of receptive fields in rat primary somatosensory cortex after hindpaw digit denervation. *Brain Res* 565, 218-224

Calford MB, Tweedale R (1990): Interhemispheric transfer of plasticity in the cerebral cortex. *Science* 249, 805-807

Calford MB, Tweedale R (1991a): Acute changes in cutaneous receptive fields in primary somatosensory cortex after digit denervation in adult flying fox. *J Neurophysiol* 65, 178-187

Calford MB, Tweedale R (1991b): Immediate expansion of receptive fields of neurons in area 3b of macaque monkeys after digit denervation. *Somatosens Mot Res* 8, 249-260

Calford MB, Tweedale R (1991c): C-fibres provide a source of masking inhibition to primary somatosensory cortex. *Proc R Soc Lond [Biol]* 243, 269-275

Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR (1996): Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol* 25, 821-828

Changeux JP, Danchin A (1976): Selective stabilization of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature* 264, 705-712

Che YH, Tamatani M, Tohyama M (2000): Changes in mRNA for post-synaptic density-95 (PSD-95) and carboxy-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase following facial nerve transection. *Brain Res Mol Brain Res* 76, 325-335

Chen DH (1978): Qualitative and quantitative study of synaptic displacement in chromatolyzed spinal motoneurons of the cat. *J Comp Neurol* 177, 635-664

Chiaia NL, Bennett-Clarke CA, Eck M, White FA, Crissman RS, Rhoades RW (1992): Evidence for prenatal competition among the central arbors of trigeminal primary efferent neurons. *J Neurosci* 12, 62-76

Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CCA, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA (2005): Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421-433

- Clark SA, Allard T, Jenkins WM, Merzenich MM (1988): Receptive fields in the body-surface map in adult cortex defined by temporally correlated inputs. *Nature* 332, 444-445
- Cohen DA, Pascual-Leone A, Press DZ, Robertson EM (2005): Off-line learning of motor skill memory: a double dissociation of goal and movement. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 18237-18241
- Cotman CW, Nieto-Sampedro M, Harris EW (1981): Synapse replacement in the nervous system of adult vertebrates. *Physiol Rev* 61, 684-784
- Dean C, Dresbach T (2006): Neuroligins and neuroligins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends Neurosci* 29, 21-29
- DeFelipe J, Conley M, Jones EG (1986): Long-range focal collateralization of axons arising from corticocortical cells in monkey sensory-motor cortex. *J Neurosci* 6, 3749-3766
- Dermietzel R, Hwang TK, Spray DS (1990): The gap junction family: structure, function and chemistry. *Anat Embryol* 182, 517-528
- Diamond ME, Armstrong-James M, Ebner FF (1993): Experience-dependent plasticity in adult rat barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 2082-2086
- Diamond ME, Huang W, Ebner FF (1994): Laminar comparison of somatosensory cortical plasticity. *Science* 265, 1885-1888
- Diamond ME, von Heimendahl M, Arabzadeh E (2008): Whisker-mediated texture discrimination. *PLoS Biol* 6, e220
- Donato R (1991): Perspectives in S-100 protein biology. *Cell Calcium* 12, 713-726
- Dörfl J (1982): The musculature of the mystacial vibrissae of the white mouse. *J Anat* 135, 147-54
- Donoghue JP, Wise SP (1982): The motor cortex of the rat: cytoarchitecture and microstimulation mapping. *J Comp Neurol* 212, 76-88
- Donoghue JP, Parham C (1983): Afferent connections of the lateral agranular field of the rat motor cortex. *J Comp Neurol* 217, 390-404
- Donoghue JP, Sanes JN (1987): Peripheral nerve injury in developing rats reorganizes representation pattern in motor cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 1123-1126

- Donoghue JP, Sanes JN (1994): Motor areas of the cerebral cortex. *J Clin Neurophysiol* 11, 382-396
- Donoghue JP, Suner S, Sanes JN (1990): Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats. II. Rapid reorganization following motor nerve lesions. *Exp Brain Res* 79, 492-503
- Dykes RW, Landry P, Metherate R, Hicks TP (1984): Functional role of GABA in cat primary somatosensory cortex: shaping receptive fields of cortical neurons. *J Neurophysiol* 52, 1066-1093
- Ehlers MD (2003): Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci* 6, 231-242
- Ehlers MD, Kaplan DR, Price DL, Koliatsos VE (1995): NGF-stimulated retrograde transport of trkA in the mammalian nervous system. *J Cell Biol* 130, 149-156
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000): Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25, 1439-1451
- Engel AK, Kreutzberg GW (1988): Neuronal surface changes in the dorsal vagal motor nucleus of the guinea pig in response to axotomy. *J Comp Neurol* 275, 181-200
- Eshraghi AA, Buchman CA, Telischi FF (2002): Sensory auricular branch of the facial nerve. *Otol Neurotol* 23, 393-396
- Farkas T, Kis Z, Toldi J, Wolff JR (1999): Activation of the primary motor cortex by somatosensory stimulation in adult rats is mediated mainly by associational connections from the somatosensory cortex. *Neurosci* 90, 353-361
- Fawcett JW, Keynes RJ (1990): Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 13, 43-60
- Ferreira A, Paganoni S (2002): The formation of synapses in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 26, 69-79
- Filosa A, Paixão S, Honsek SD, Carmona MA, Becker L, Feddersen B, Gaitanos L, Rudhard Y, Schoepfer R, Klopstock T, Kullander K, Rose CR, Pasquale EB, Klein R (2009): Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. *Nat Neurosci* 12, 1285-1292
- Franchi G (2002): Time course of motor cortex reorganization following botulinum toxin injection into the vibrissal pad of the adult rat. *Eur J Neurosci* 16, 1333-1348

Franck JI (1980): Functional reorganization of cat somatic sensory-motor cortex (SmI) after selective dorsal root rhizotomies. *Brain Res* 186, 458-462

Garner CC, Zhai RG, Gundelfinger ED, Ziv NE (2002): Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 25, 243-251

Garraghty PE, Kaas JH (1992): Dynamic features of sensory and motor maps. *Curr Opin Neurobiol* 2, 522-527

Garthwaite J (2008): Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* 27, 2783-2802

Ghosh S, Porter R (1988): Morphology of pyramidal neurones in monkey motor cortex and the synaptic actions of their intracortical axon collaterals. *J Physiol* 400, 593-615

Gilad GM, Gilad VH (1983): Polyamine biosynthesis is required for survival of sympathetic neurons after axonal injury. *Brain Res* 273, 191-194

Gilad VH, Tetzlaff WG, Rabey JM, Gilad GM (1996): Accelerated recovery following polyamines and aminoguanidine treatment after facial nerve injury in rats. *Brain Res* 724, 141-144

Goubard V, Fino E, Venance L (2011): Contribution of astrocytic glutamate and GABA uptake to corticostriatal information processing. *J Physiol* 589, 2301-2319

Graeber MB, Kreutzberg GW (1986): Astrocytes increase in glial fibrillary acidic protein during retrograde changes of facial motor neurons. *J Neurocytol* 15, 363-373

Graeber MB, Kreutzberg GW (1988): Delayed astrocyte reaction following facial nerve axotomy. *J Neurocytol* 17, 209-220

Graeber MB, Kreutzberg GW: Astrocytic reactions accompanying motor neuron regeneration; in: *Advances in Neural Regeneration Research*; hrsg. v. Seil FJ; Alan R. Liss, New York 1990, 215–224

Graeber MB, Tetzlaff W, Streit WJ, Kreutzberg GW (1988): Microglial cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy. *Neurosci Lett* 85, 317-321

Graeber MB, Bise K, Mehraein P (1993): Synaptic stripping in the human facial nucleus. *Acta Neuropathol* 86, 179-181

Graeber MB, von Eitzen U, Grosbon-Frodl E, Egensperger R, Kosel S: Microglia: a “sensor” of

pathology in the human CNS; in: Neurotraumatology - Biomechanic Aspect, Cytologic and Molecular Mechanisms; hrsg. v. Oehmichen M, König HG; Schmidt-Romhild-Verlag, Lübeck 1997, 239 - 252

Graeber MB, López-Redondo F, Ikoma E, Ishikawa M, Imai Y, Nakajima K, Kreutzberg GW, Kohsaka S (1998): The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Res* 813, 241-253

Graf ER, Zhang X, Jin S-X, Linhoff MW, Craig AM (2004): Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 119, 1013-1026

Greene EC: Anatomy of the rat. 1. Auflage; American Philosophical Society, Philadelphia 1935

Grinevich V, Brecht M, Osten P (2005): Monosynaptic Pathway from Rat Vibrissa Motor Cortex to Facial Motor Neurons Revealed by Lentivirus-Based Axonal Tracing. *J Neurosci* 25, 8250 -8258

Guié-Robles E, Valdivieso C, Guajardo G (1989): Rats can learn a roughness discrimination using only their vibrissal system. *Behav Brain Res* 31, 285-289

Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Schulte E, Stennert E (1996): Quantitative image analysis of the chromatolysis in rat facial and hypoglossal motoneurons following axotomy with and without reinnervation. *Cell Tissue Res* 286, 537-541.

Haas CA, Donath C, Kreutzberg GW (1993): Differential expression of immediate early genes after transection of the facial nerve. *Neuroscience* 53, 91-99

Halegoua S, Armstrong RC, Kremer NE (1991): Dissecting the mode of action of a neuronal growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol* 165, 119-170

Hall RD, Lindholm EP (1974): Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rat. *Brain Res* 66, 23-38

Hanisch U-K, Kettenmann H (2007): Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10, 1387-1394

Hattox AM, Priest CA, Keller A (2002): Functional circuitry involved in the regulation of whisker movements. *J Comp Neurol* 442, 266-276

Hattox A, Li Y, Keller A (2003): Serotonin regulates rhythmic whisking. *Neuron* 39, 343-352



- Hebb DO: The organization of behavior. A neuropsychological theory. 1. Auflage; John Wiley & Sons, London 1949
- Hendry IA, Stöckel K, Thoenen H, Iversen LL (1974): The retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain Res* 68, 103-121
- Henn F (1982): Neurotransmitters and astroglia lead to neuromodulation. *Prog Brain Res* 55, 241-252
- Hess G, Donoghue JP (1994): Long-term potentiation of horizontal connections provides a mechanism to reorganize motor maps. *J Neurophysiol* 71, 2543-2547
- Hicks TP, Dykes RW (1983): Receptive field size for certain neurons in primary somatosensory cortex is determined by GABA-mediated intracortical inhibition. *Brain Res* 274, 160-164
- Hugh Perry V, O'Connor V (2010): The role of microglia in synaptic stripping and synaptic degeneration: a revised perspective. *ASN Neuro* 2, 281-291
- Humphrey DR, Qiu XO, Clavel P, O'Donoghue DL (1990): Changes in forelimb motor representations in monkey motor cortex induced by passive movements. *Soc Neurosci Abstr* 16, 422
- Huntley GW, Jones EG (1991): Relationship of intrinsic connections to forelimb movement representations in monkey motor cortex: a correlative anatomic and physiological study. *J Neurophysiol* 66, 390-413
- Hutson KA, Masterton RB (1986): The sensory contribution of a single vibrissa's cortical barrel. *J Neurophysiol* 56, 1196-223
- Innocenti GM (1981): Growth and reshaping of axons in the establishment of visual callosal connections. *Science* 212, 824-827
- Innocenti GM, Clarke S (1984): The organization of immature callosal connections. *J Comp Neurol* 230, 287-309
- Iriki A, Pavlides C, Keller A, Asanuma H (1989): Long-term potentiation in the motor cortex. *Science* 254, 1385-1387
- Iriki A, Pavlides C, Keller A, Asanuma H (1991): Long-term potentiation of thalamic input to the motor cortex induced by coactivation of thalamocortical and corticocortical afferents. *J Neurophysiol* 65, 1435-1441

- Ivy GO, Killackey HP (1982): Ontogenetic changes in the projections of neocortical neurons. *J Neurosci* 2, 735-743
- Izraeli R, Porter LL (1995): Vibrissal motor cortex in the rat: connections with the barrel field. *Exp Brain Res* 104, 41-54
- Jacobs KM, Donoghue JP (1991): Reshaping the cortical motor map by unmasking latent intracortical connections. *Science* 251, 944-947
- Jenkins WM, Merzenich MM, Ochs MT, Allard T, Guic-Robbes E (1990): Functional reorganization of primary somatosensory cortex in adult owl monkeys after behaviourally controlled tectal stimulation. *J Neurophysiol* 63, 82-104
- Jensen MB, Hegelund IV, Poulsen FR, Owens T, Zimmer J, Finsen B (1999): Microglial reactivity correlates to the density and the myelination of the anterogradely degenerating axons and terminals following perforant path denervation of the mouse fascia dentata. *Neuroscience* 93, 507-518
- Jin TE, Witzemann V, Brecht M (2004): Fiber types of the intrinsic whisker muscle and whisking behavior. *J Neurosci* 24, 3386-3393
- Kaas JH (1991): Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals. *Annu Rev Neurosci* 14, 137-167
- Kaas JH, Merzenich MM, Killackey HP (1983): The reorganization of somatosensory cortex following peripheral nerve damage in adult and developing mammals. *Annu Rev Neurosci* 6, 325-356
- Kalaska J, Pomeranz B (1979): Chronic paw deafferentation causes an age-dependent appearance of novel responses from forearm in "paw cortex" of kittens and adult cats. *J Neurophysiol* 42, 618-633
- Kalla R, Liu Z, Xu S, Koppius A, Imai Y, Kloss CU, Kohsaka S, Gschwendtner A, Möller JC, Werner A, Raivich G (2001): Microglia and the early phase of immune surveillance in the axotomized facial motor nucleus: impaired microglial activation and lymphocyte recruitment but no effect on neuronal survival or axonal regeneration in macrophage-colony stimulating factor-deficient mice. *J Comp Neurol* 436, 182-201
- Kandel E: Auf der Suche nach dem Gedächtnis: Die Entstehung einer neuen Wissenschaft des Geistes. 1. Auflage; Siedler, München 2009
- Kandel E, Schwartz J, Jessel T: Neurowissenschaften: Eine Einführung. 1. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1995

Kandel E, Schwartz J, Jessell T: Principles of Neural Science. 4. Auflage; McGraw-Hill Medical, New York 2000

Kelahan AM, Doetsch GS (1981): Short-term changes in the functional organization of somatosensory (Sml) cortex of adult racoons after digit amputation. Soc Neurosci Abstr 7, 540

Kelahan AM, Doetsch GS (1984): Time-dependent changes in the functional organization of somatosensory cerebral cortex following digit amputation in adult racoons. Somatosens Res 2, 49-81

Kelahan AM, Ray RH, Carson LV, Massey CE, Doetsch GS (1981): Functional reorganization of adult racoon somatosensory cerebral cortex following neonatal digit amputation. Brain Res 223, 151-159

Keller A (1993): Intrinsic connections between representation zones in the cat motor cortex. Neuroreport 4, 515-518

Killackey HP, Chalupa LM (1986): Ontogenetic change in the distribution of callosal projection neurons in the postcentral gyrus of the fetal rhesus monkey. J Comp Neurol 244, 331-348

Killackey HP, Gould HJ, Cusick CG, Pons TP, Kaas HJ (1983): The relation of corpus callosum connections to architectonic fields and body surface maps in sensorimotor cortex of new and old world monkeys. J Comp Neurol 219, 384-419

Killackey HP, Bennett-Clarke CA, Eck M, Rhoades RW (1994): Peripheral influences on the size and organization of somatotopic representations in the fetal rat corex. J Neurosci 14, 1496-1506

Kishida KT, Klann E (2007): Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. Antioxid Redox Signal 9, 233-244

Kuczynski K (1980): Histology of the peripheral nerve trunks. Int Surg 65, 495-498

Küry P, Stoll G, Müller HW (2001): Molecular mechanisms of cellular interactions in peripheral nerve regeneration. Curr Opin Neurol 14, 635-639

Kuypers HG (1982): A new look at the organization of the motor system. Prog Brain Res 57, 381-403

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685

Landgrebe M: Funktionelle und strukturelle Reorganisation somatotoper Repräsentationen im primären Motorkortex adulter Ratten nach Durchtrennung des Nervus facialis. Med. Diss. Göttingen. 1997

Landgrebe M, Laskawi R, Wolff JR (2000): Transient changes in cortical distribution of S100 proteins during reorganization of somatotopy in the primary motor cortex induced by facial nerve transection in adult rats. *Eur J Neurosci* 12, 3729-3740

Laskawi R, Wolff JR (1996): Changes in the Phosphorylation of Neurofilament Proteins in Facial Motoneurons following Various Types of Nerve Lesion. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 58, 13-22

Laskawi R, Landgrebe M, Wolff JR (1996): Electron microscopical evidence of synaptic reorganization in the contralateral motor cortex of adult rats following facial nerve lesion. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 58, 266-270

Laskawi R, Rohlmann A, Landgrebe M, Wolff JR (1997): Rapid astroglial reactions in the motor cortex of adult rats following peripheral facial nerve lesions. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 254, 81-85

Lee KJ, Woolsey TA (1975): A proportional relationship between peripheral innervation density and cortical neuron number in the somatosensory system of the mouse. *Brain Res* 99, 349-353

Lieberman AR (1971): The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int Rev Neurobiol* 14, 49-124

Ma PM (1991): The barrelettes–architectonic vibrissal representations in the brainstem trigeminal complex of the mouse. I. Normal structural organization. *J Comp Neurol* 309, 161-199

Marchetti B (1997): Cross-talk signals in the CNS: role of neurotrophic and hormonal factors, adhesion molecules and intercellular signaling agents in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-astroglial interactive network. *Front Biosci* 2, 88-125

Mattox DE, Felix H (1987): Surgical anatomy of the rat facial nerve. *Am J Otol* 8, 43-47

Mattsson P, Janson AM, Aldskogius H, Svensson M (2001): Nimodipine promotes regeneration and functional recovery after intracranial facial nerve crush. *J Comp Neurol* 437, 106-117

Mauch DH, Nägler K, Schumacher S, Göritz C, Müller EC, Otto A, Pfrieder FW (2001): CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294, 1354-1357

- McMahon HT, Bolshakov VY, Janz R, Hammer RE, Siegelbaum SA, Südhof TC (1996): Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 4760-4764
- Merzenich MM, Kaas JH, Wall JT, Nelson RJ, Sur M, Felleman DH (1983 a): Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation. *Neuroscience* 8, 33-55
- Merzenich MM, Nelson RJ, Sur M, Wall JT, Felleman DH, Kaas JH (1983 b): Progression of change following median nerve section in the cortical representation of the hand in areas 3b and 1 in adult owl and squirrel monkeys. *Neuroscience* 10, 639-665
- Merzenich MM, Nelson RJ, Stryker MP, Cynader MS, Schoppmann A, Zook JM (1984): Somatosensory cortical map changes following digit amputation in adult monkeys. *J Comp Neurol* 224, 591-605
- Metzler J, Marks PS (1979): Functional changes in cat somatic sensory-motor cortex during short-term reversible epidural blocks. *Brain Res* 177, 379-383
- Meyer G, Varoqueaux F, Neeb A, Oschlies M, Brose N (2004): The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: a case study on neuroligin. *Neuropharmacology* 47, 724-733
- Missler M, Eins S, Böttcher H, Wolff JR (1994): Postnatal development of glial fibrillary acidic protein, vimentin and S100 protein in monkey visual cortex: evidence for a transient reduction of GFAP immunoreactivity. *Brain Res Dev Brain Res* 82, 103-117
- Miyashita E, Keller A, Asanuma H (1994): Input-output organization of the rat vibrissal motor cortex. *Exp Brain Res* 99, 223-232
- Mogilner A, Grossman JA, Ribary U, Joliot M, Volkmann J, Rapaport D, Beasley RW, Llinas RR (1993): Somatosensory cortical plasticity in adult humans revealed magnetoencephalography. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 3593-3597
- Moore BW (1988): Conformational and hydrophobic properties of rat and bovine S-100 proteins. *Neurochem Res* 13, 539-545
- Moore KL, Persaud TVN, Lütjen-Drecoll E, Drecoll EL: *Embryologie - Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen*, 4. Auflage; Schattauer Verlag, Stuttgart 1996
- Moran LB, Graeber MB (2004): The facial nerve axotomy model. *Brain Res* 44, 154-178

Nordin M, Hagbarth KE (1989): Mechanoreceptive units in the human infra-orbital nerve. *Acta Physiol Scand* 135, 149-161

Nudo RJ, Merzenich MM (1987): Repetitive intracortical microstimulation alters the area 4 representation of movements. *Soc Neurosci Abstr* 13, 1596

Nudo RJ, Jenkins WM, Merzenich MM (1990): Repetitive microstimulation alters the cortical representation of movements in adult rats. *Somatosens Mot Res* 7, 463-483

O'Leary DD, Ruff NL, Dyck RH (1994): Development, critical period plasticity, and adult reorganizations of mammalian somatosensory systems. *Curr Opin Neurobiol* 4, 535-544

Paxinos G: *The rat nervous system*. 2. Auflage; Academic Press, San Diego 1995

Paxinos G, Watson C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4. Auflage; Academic Press, San Diego 1998

Pearce AJ, Thickbroom GW, Byrnes ML, Mastaglia FL (2000): Functional reorganisation of the corticomotor projection to the hand in skilled racquet players. *Exp Brain Res* 130, 238-243

Penfield W, Rasmussen T: *The cerebral cortex of man a clinical study of localization of function*. 2. Auflage; Hafner, New York 1968

Perea G, Araque A (2007): Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317, 1083-1086

Perea G, Araque A (2010): GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev* 63, 93-102

Perea G, Navarrete M, Araque A (2009): Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32, 421-431

Perry VH, O'Connor V (2010): The role of microglia in synaptic stripping and synaptic degeneration: a revised perspective. *ASN Neuro* 2, pii: e00047

Petersen CC (2007): The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* 56, 339-355.

Pfrieger, FW: The role of glia in the development of synaptic contacts; in: *The tripartite synapse - glia in synaptic transmission*; hrsg. v. Volterra A, Magistretti PJ, Haydon PG; Oxford University Press, Oxford 2002, 24-34

- Pfrieger FW, Barres BA (1997): Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 277, 1684-16847
- Pons TP, Garraghty PE, Mishkin M (1988): Lesion-induced plasticity in the second somatosensory cortex of adult macaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 5279-5281
- Porter R, Lemon R (1993): Corticospinal function and voluntary movement, *Monographs Physiol Soc* 45, 1-428
- Quan D, Bird SJ (1999): Nerve conduction studies and electromyography in the evaluation of peripheral nerve injuries. *J Orthop* 12 45-51
- Quarles RH (2002): Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration. *Cell Mol Life Sci* 59, 1851-1871
- Rao K, Lund RD (1993): Optic nerve degeneration induces the expression of MHC antigens in the rat visual system. *J Comp Neurol* 336, 613-27
- Rasmusson DD (1982): Reorganization of racoon somatosensory cortex following removal of the 5th digit. *J Comp Neurol* 205, 313-326
- Reynolds ES (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17, 208 –212.
- Rickmann M, Wolff JR (1995a): S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain. *Neuroscience* 67, 977-991
- Rickmann M, Wolff JR (1995b): Modifications of S100-protein immunoreactivity in rat brain induced by tissue preparation. *Histochem Cell Biol* 103, 135-145
- Rickmann M, Wolff JR, Meyer DL (1995): Expression of S100 protein in the vestibular nuclei during compensation of unilateral labyrinthectomy symptoms. *Brain Res* 688, 8-14
- Rishal I, Fainzilber M (2010): Retrograde signaling in axonal regeneration. *Exp Neurol* 223, 5-10
- Rohlmann A, Laskawi R, Hofer A, Dobo E, Dermietzel R, Wolff JR (1993): Facial nerve lesions lead to increased immunostaining of the astrocytic gap junction protein (connexin 43) in the corresponding facial nucleus of rats. *Neurosci Lett* 154, 206-208
- Rohlmann A, Laskawi R, Hofer A, Dermietzel R, Wolff JR (1994): Astrocytes as rapid sensors of peripheral axotomy in the facial nucleus of rats. *Neuroreport* 5, 409-412

- Sachdev RN, Sato T, Ebner FF (2002): Divergent movement of adjacent whiskers. *J Neurophysiol* 87, 1440-1448
- Sachdev RN, Berg RW, Champney G, Kleinfeld D, Ebner FF (2003): Unilateral vibrissa contact: changes in amplitude but not timing of rhythmic whisking. *Somatosens Mot Res* 20, 163-169
- Sanes JN und Donoghue JP: Static and dynamic organization of motor cortex; in: *Advances in Neurology*; Band 73; hrsg. Freund HJ, Sabel BA; Lippincott-Raven, Philadelphia 1997, 277-296
- Sanes JN, Donoghue JP (2000): Plasticity and primary motor cortex. *Annu Rev Neurosci* 23, 393-415
- Sanes JN, Suner S, Lando JF, Donoghue JP (1988): Rapid reorganization of adult rat motor cortex somatic representation patterns after motor nerve injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 2003-2007
- Sanes JN, Suner S, Donoghue JP (1990): Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats. I. Long-term patterns of reorganization following motor or mixed peripheral nerve lesions. *Exp Brain Res* 79, 479-491
- Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T (2000): Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101, 657-669
- Schott GD (1993): Penfield's homunculus: a note on cerebral cartography. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 56, 329-333
- Schubert D, Kötter R, Staiger JF (2007): Mapping functional connectivity in barrel-related columns reveals layer-and celltype-specific microcircuits. *Brain Struct Funct* 212, 107-119
- Schwartz JP (1992): Neurotransmitters as neurotrophic factors: a new set of functions. *Int Rev Neurobiol* 315, 385-389
- Semba K, Egger MD (1986): The facial „motor“ nerve of the rat: control of vibrissal movement and examination of motor and sensory components. *J Comp Neurol* 247, 144-158
- Shaw CA und McEachern JC: Is there a general theory of neuroplasticity?; in: *Toward a theory of neuroplasticity*. 1. Auflage; hrsg. v. Shaw CA, McEachern J; Psychology Press, Philadelphia 2001
- Sievert CF, Neafsey EJ (1986): A chronic unit study of the sensory properties of neurons in the forelimb areas of rat sensorimotor cortex. *Brain Res* 381, 15-23
- Sillito AM (1975): The contribution of inhibitory mechanisms to the receptive field properties of



neurones in the striate cortex of the cat. *J Physiol* 250, 305-329

Simons DJ (1978): Response properties of vibrissa units in rat SI somatosensory neocortex. *J Neurophysiol* 41, 798- 820

Song JY, Ichtchenko K, Südhof TC, Brose N (1999): Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1100-1105

Streit WJ, Kreutzberg GW (1988): Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *J Comp Neurol* 268, 248-263

Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988): Functional plasticity of microglia: A review. *Glia* 1, 301-307

Sumitani M, Miyauchi S, Uematsu H, Yozu A, Otake Y, Yamada Y (2010): [Phantom limb pain originates from dysfunction of the primary motor cortex]. *Masui* 59, 1364-1369

Sumner BE (1975): A quantitative analysis of the response of presynaptic boutons to postsynaptic motor neuron axotomy. *Exp Neurol* 46, 605-615

Sunico CR, Portillo F, González-Forero D, Moreno-López B (2005): Nitric-oxide-directed synaptic remodeling in the adult mammal CNS. *J Neurosci* 25, 1448-1458

Svensson M, Aldskogius H (1993): Synaptic density of axotomized hypoglossal motoneurons following pharmacological blockade of the microglial cell proliferation. *Exp Neurol* 120, 123-131

Svensson M, Eriksson NP, Aldskogius H (1993): Evidence for activation of astrocytes via reactive microglial cells following hypoglossal nerve transection. *J Neurosci Res* 35, 373-381

Tarsa L, Goda Y (2002): Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 1012-1016

Taverner D (1974): Anatomie, pathologie et chirurgie du nerf facial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 37, 117

Tetzlaff W, Kreutzberg GW (1985): Ornithine decarboxylase in motoneurons during regeneration. *Exp Neurol* 89, 679-688

Tetzlaff W, Bisby MA, Kreutzberg GW (1988a): Changes in cytoskeletal proteins in the rat facial nucleus following axotomy. *J Neurosci* 8, 3181-3189

Tetzlaff W, Graeber MB, Bisby MA, Kreutzberg GW (1988b): Increased glial fibrillary acidic protein synthesis in astrocytes during retrograde reaction of the rat facial nucleus. *Glia* 1, 90-95

Tetzlaff W, Gilad VH, Leonard C, Bisby MA, Gilad GM (1988c): Retrograde changes in transglutaminase activity after peripheral nerve injuries. *Brain Res* 445, 142-146

Toldi J, Laskawi R, Landgrebe M, Wolff JR (1996): Biphasic reorganization of somatotopy in the primary motor cortex follows facial nerve lesion in adult rats. *Neurosci Lett* 203, 179-182

Toldi J, Farkas T, Perge J, Wolff JR (1999): Facial nerve injury produces a latent somatosensory input through recruitment of the motor cortex in the rat. *Neuroreport* 10, 2143-2147

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24, 145-149

Trapp BD, Wujek JR, Criste GA, Jalabi W, Yin X, Kidd GJ, Stohlman S, Ransohoff R (2007): Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia* 55, 360-368

Tsai TC, Wu CH, Wen CY, Shieh JY (1993): Studies of the motoneurons following the injection of horseradish peroxidase into the peripheral branches of the facial nerve in rats. *Acta Anat (Basel)* 148, 42-48

Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001): Control of synapse number by glia. *Science* 291, 657-661

Van der Loos H (1976): Barreloids in mouse somatosensory thalamus. *Neurosci Lett* 2, 1-6

Varoqueaux F, Jamain S, Brose N (2004): Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur J Cell Biol* 83, 449-456

Vélez-Fort M, Audinat E, Angulo MC (2011): Central Role of GABA in Neuron-Glia Interactions. *Neuroscientist*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21609943>

Ventura R, Harris KM (1999): Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19, 6897-6906

Volterra A, Meldolesi J (2005): Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6, 626-640.

Volterra A, Magistretti PJ, Haydon PG, Volterra A, Magistretti PJ, Haydon PG (2002): The tripartite synapse: glia in synaptic transmission. Available at: <http://infoscience.epfl.ch/record/143495>

- Waite PME, Trigeminal sensory system; in: The rat nervous system; hrsg. v. Paxinos G; Academic, San Diego 2004, 817– 851
- Wall JT, Cusick CG, Kaas JH (1981): Evidence for incomplete reorganization of the S-I foot representation following sciatic nerve section in the adult rat. *Neurosci Abstr* 7, 758
- Wall JT, Cusick CG (1984): Cutaneous responsiveness in primary somatosensory (S-I) hindpaw cortex before and after partial hindpaw deafferentation in adult rats. *J Neurosci* 4, 1499-1515
- Wang X, Merzenich MM, Sameshima K, Jenkins WM (1995): Remodelling of hand representation in adult cortex determined by timing of tectal stimulation. *Nature* 378, 71-75
- Watson CR, Sakai S, Armstrong W (1982): Organization of the facial nucleus in the rat. *Brain Behav Evol* 20, 19-28
- Watson WE (1974): Cellular responses to axotomy and to related procedures. *Br Med Bull* 30, 112-115
- Weber K, Osborn M (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244, 4406-4412
- Welker C (1971): Microelectrode delineation of fine grain somatotopic organization of (SmI) cerebral neocortex in albino rat. *Brain Res* 26, 259-275
- Welker C, Woolsey TA (1974): Structure of layer IV in the somatosensory neocortex of the rat: description and comparison with the mouse. *J Comp Neurol* 158, 437-453
- Welsch U: Lehrbuch Histologie. 2. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer Verlag 2006
- WHO (World Health Organization): International classification of functioning, disability and health (ICF). Geneva: 2001 Available from: <http://www.who.int/classifications/icf/en/>
- Wineski LE (1985): Facial morphology and vibrissal movement in the golden hamster. *J Morphol* 183, 199-217
- Wittenmayer N, Körber C, Liu H, Kremer T, Varoquaux F, Chapman ER, Brose N, Kuner T, Dresbach T (2009): Postsynaptic Neuroligin1 regulates presynaptic maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 13564-13569
- Wolff JR, Missler M (1992): Synaptic reorganization in developing and adult nervous systems. *Ann Anat* 174, 393-403

- Wolff JR, Laskawi R, Spatz WB, Missler M (1995): Structural dynamics of synapses and synaptic components. *Behav Brain Res* 66, 13-20
- Woolsey TA, Van der Loos H (1970): The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 17, 205-242
- Wree A, Lutz B, Thole U (1992) Volumes of the cytoarchitectonic areas in the rat cerebral cortex. *J Hirnforsch* 33, 545-548
- Yip HK, Johnson EM Jr (1986): Comparative dynamics of retrograde transport of nerve growth factor and horseradish peroxidase in rat lumbar dorsal root ganglia. *J Neurocytol* 15, 789-798
- Yu W-HA (2002): Spatial and temporal correlation of nitric oxide synthase expression with CuZn-superoxide dismutase reduction in motor neurons following axotomy. *Ann NY Acad Sci* 962, 111-121
- Záborszky L, Wolff JR (1982): Distribution Patterns and Individual Variations of Callosal Connections in the Albino Rat. *Anat Embryol* 165, 213-232
- Zarzecki P (1991): The distribution of corticocortical, thalamocortical, and callosal inputs on identified motor cortex output neurons: mechanisms for their selective recruitment. *Somatosens Mot Res* 8, 313-325
- Zhou XF, Rush RA (1996 a): Endogenous brain-derived neurotrophic factor is anterogradely transported in primary sensory neurons. *Neuroscience* 74, 945-953
- Zhou XF, Rush RA (1996 b): Functional roles of neurotrophin 3 in the developing and mature sympathetic nervous system. *Mol Neurobiol* 13, 185-197
- Ziemann U, Hallett M, Cohen LG (1998): Mechanisms of deafferentation-induced plasticity in human motor cortex. *J Neurosci* 18, 7000-7007
- Zierz S, Tackmann W (1989): Adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy-clinical spectrum, pathobiochemical aspects, diagnosis and therapy. *Fortschr Neurol Psychiatr* 57, 527-534
- Zilles K, Wree A: Cortex: areal and laminar structure; in: *The rat nervous system*; hrsg. v. Paxinos G; Academic Press, San Diego 1995, 649 – 685
- Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD (2005): Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci* 6, 615-625

## DANKSAGUNG

Herrn PD Dr. med. Michael Rickmann möchte ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas, die Möglichkeit unter seiner Leitung arbeiten zu können, sowie für seine Geduld danken. Von ihm habe ich viel über den kritischen Umgang mit wissenschaftlichen Fragestellungen gelernt.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Nils Brose danke ich für die Bereitstellung des Neuroligin 1 - Antikörpers, sowie für seine Bereitschaft, mich an seinen Laborseminaren im Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin teilhaben zu lassen. Für die Einweisung in die für diese Arbeit relevanten molekularbiologischen Arbeitsschritte danke ich seiner Mitarbeiterin Dr. rer. nat. Antje Neeb.

Ein besonderer Dank geht an Frau Herma Böttcher, die mir bei der Durchführung zahlreicher Perfusionen und immunhistochemischer Versuche behilflich war, und von der ich viel über neuroanatomisches Experimentieren gelernt habe.

Herrn Rod Dungan danke ich für seine Unterstützung bei der Bildbearbeitung, inklusive Einarbeitung in die erforderliche Software. Er war jederzeit für Fragen ansprechbar und ausgesprochen hilfsbereit. Für die Einführung in die Operationstechniken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. M. Landgrebe bedanken.

Für wertvolle moralische Unterstützung danke ich besonders Frau Dr. rer. nat. Silke Günther sowie Herrn Dr. med. Andreas Gohritz. Ebenso möchte ich Herrn Dr. med. Ivo Chao danken, der mir während meiner Zeit als studentische Hilfskraft der Neuronatomischen Abteilung viel Detailwissen über anatomische Fragestellungen, insbesondere über Glia, vermittelte.

Den experimentellen Teil dieser Arbeit führte ich im Rahmen meiner dreijährigen Teilnahme als Stipendiatin im Graduiertenkolleg "Neuroplasticity - From Molecules to Systems" (Projekt-Nr. GRK 632/1-00) durch. Für dieses Stipendium bin ich dankbar.

Herrn Prof. Dr. med. Bleich, Zentrum für Seelische Gesundheit der MHH, danke ich für die Klinische Rückendeckung, die es mir ermöglicht hat, die vorliegende Arbeit zu beenden.

Danken möchte ich zuletzt Herrn Prof. Dr. med. Dietrich Lothar Meyer († 1999), der ursprünglich mein Interesse für neuroanatomische Fragestellungen geweckt und nachhaltig geprägt hat.