

Aus der Neurologischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Restitution motorischer Funktion durch Adaption prämotorischer kortikaler
Erregbarkeit nach künstlich induzierter reversibler Hemmung des primär motorischen
Areal.

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Robert Fleischmann
aus Halle (Saale)

Datum der Promotion: 04.09.2015

*In some ways we feel that we are as confused as ever,
but we think we are confused on a higher level
and about more important things.*

Earl Clarence Kelley

Inhaltsverzeichnis

1	Abstrakt (Deutsch)	5
2	Abstract (English)	7
3	Einführung	9
4	Methodik	10
4.1.	Navigierte transkranielle Magnetstimulation	10
4.2.	Kartierung	10
4.3.	Kortikospinale, intrakortikale und interhemisphärische Erregbarkeit	11
4.4.	Studie I: Nicht-physiologische Einflussfaktoren in nTMS-Studien	11
	4.4.1. <i>Probanden</i>	11
	4.4.2. <i>Elektrophysiologische Maße und Design</i>	11
	4.4.3. <i>Signalverarbeitung und Statistik</i>	12
4.5.	Studie II: Die Reliabilität topografischer Messungen	12
	4.5.1. <i>Probanden</i>	12
	4.5.2. <i>Studiendesign</i>	13
	4.5.3. <i>Datenauswertung und Statistik</i>	13
4.6.	Studie III: Entwicklung prämotorischer kortikaler Erregbarkeit nach kathodaler Hemmung des primären Motorkortex	13
	4.6.1. <i>Probanden</i>	13
	4.6.2. <i>Design</i>	13
	4.6.3. <i>Primär motorische und prämotorische Kartierung</i>	14
	4.6.4. <i>Transkranielle Gleichstromstimulation</i>	14
	4.6.5. <i>Datenauswertung und Statistik</i>	14
5	Ergebnisse	15
5.1.	Studie I: Nicht-physiologische Einflussfaktoren in nTMS-Studien	15
5.2.	Studie II: Die Reliabilität topografischer Messungen	15
5.3.	Studie III: Entwicklung prämotorischer kortikaler Erregbarkeit nach kathodaler Hemmung des primären Motorkortex	16
	5.3.1. <i>Prämotorische Kartierung</i>	16
	5.3.2. <i>Motorische Funktion</i>	17
	5.3.3. <i>Elektrophysiologische Parameter (M1)</i>	17
	5.3.4. <i>Elektrophysiologische Parameter (PMC)</i>	18

5.3.5. <i>Regressionsanalyse</i>	18
6 Diskussion	18
6.1. Reduktion der physiologischen und physikalischen Varianz motorisch evozierter Potentiale mittels navigierter TMS	19
6.2. Intra- und Interrater-Reliabilität navigierter Hirnstimulation bei Normalprobanden und Patienten mit perirolandischen Tumoren	20
6.3. Adaption prämotorischer Erregbarkeit nach künstlicher Hemmung der primär motorischen Erregbarkeit sowie deren Bedeutung für die Restitution einfacher motorischer Fertigkeiten	21
6.4. Zusammenfassung	23
7 Referenzen	23
8 Anteilserklärung	25
9 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	29
9.1. Publikation I	29
9.2. Publikation II	39
9.3. Publikation III	48
10 Lebenslauf	58
11 Komplette Publikationsliste	62
11.1. Originalarbeiten	62
11.2. Fallberichte	62
11.3. Abstracts	63
12 Danksagung	65

1 Abstrakt (Deutsch)

Hintergrund

Läsionen im motorischen System führen beim Menschen zu einer plastischen Reorganisation nicht betroffener motorischer Areale. So sind Aktivitätsänderungen im prämotorischen Kortex (PMC) nach Schlaganfall im ipsilateralen primär motorischen Kortex (M1) gezeigt. Es ist nicht abschließend geklärt, ob und wie diese die Restitution motorischer Fertigkeiten fördern. Dies soll in mehreren dieser Dissertation zu Grunde liegenden Studien bei neurologisch gesunden Probanden (Normalprobanden) modellhaft untersucht werden.

Eine Voraussetzung zur Evaluation von Restitutionsmechanismen ist die Möglichkeit neurophysiologischer Untersuchungen des PMC und der M1-PMC-Interaktion. Die transkranielle Magnetstimulation (TMS) ist für die Untersuchung kortikaler neurophysiologischer Vorgänge etabliert, jedoch für den PMC unzureichend räumlich aufgelöst. In der ersten Studie sollte daher bei Normalprobanden die suffiziente Auflösung der weiterentwickelten neuronavigierten TMS (nTMS) untersucht werden. In der zweiten Studie sollte zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit und breiten Anwendbarkeit der nTMS-Ergebnisse die Interrater- und Retest-Reliabilität bestimmt werden. In der dritten Studie hatte ich das Ziel erstmals prämotorische kortikospinale Efferenzen beim Menschen nachzuweisen und prämotorische Restitutionsmechanismen am Modell einer künstlich induzierten reversiblen Hemmung der M1-Erregbarkeit und –Funktion zu untersuchen.

Methoden

Die erste Studie verglich den Einfluss physikalischer Störfaktoren auf die Variabilität motorisch evozierter Potentiale (MEP) zwischen TMS und nTMS. Zudem wurde die prädiktive Validität der geschätzten intrakortikalen elektrischen Feldstärke für die MEP-Amplitude untersucht. Die zweite Studie untersuchte die Test-Retest-Reliabilität sowie Interrater-Reliabilität bei Normalprobanden und Patienten mit perirolandischen Tumoren. In der dritten placebokontrollierten, doppelblinden und randomisierten Studie evaluierte ich neurophysiologische Grundlagen des Restitutionspotentials des PMC bei Normalprobanden. Hierzu wurde mittels kathodaler transkranieller Gleichstromstimulation (c-tDCS) eine M1-Hemmung induziert und der Einfluss der konsekutiven Adaptation TMS-basierter Parameter der intrakortikalen M1-

und kortikospinalen M1- sowie PMC-Erregbarkeit auf die motorische Funktion untersucht.

Ergebnisse

NTMS ist ein für Normalprobanden und Patienten gleichermaßen reliables Untersuchungsinstrument. Die Schätzung intrakortikal induzierter elektrischer Felder ist zudem ein valider Prädiktor der MEP-Amplitude. Dies ermöglicht bei gleichzeitig optimierter räumlicher Auflösung eine zuverlässige Identifizierung humaner prämotorischer kortikospinaler Projektionen. Die Untersuchung prämotorischer Efferenzen nach c-tDCS induzierter transienter Hemmung primär motorischer Erregbarkeit und Funktion zeigt eine konsekutiv erhöhte Erregbarkeit, welche signifikanter Prädiktor motorischer Leistungsfähigkeit ist.

Diskussion und Zusammenfassung

In den Veröffentlichungen zu dieser Dissertation konnte erstmals die neurophysiologische Untersuchbarkeit prämotorischer kortikospinaler Verbindungen beim Menschen mittels nTMS belegt werden. Der PMC kompensiert eine abgeschwächte M1-Erregbarkeit und trägt zum Erhalt motorischer Leistungsfähigkeit bei. Damit steht ein potentieller neuer Untersuchungsparameter zur Verfügung, der untersucherunabhängig die Integrität prämotorischer kortikospinaler Verbindungen messen kann und möglicherweise einen Verlaufs- und Prognoseparameter für die postläsionelle Restitution motorischer Fertigkeiten darstellt.

2 Abstract (English)

Background

Disruptions in the human motor system cause plastic changes in non-affected areas. Activity changes in the premotor cortex (PMC) following lesions (e.g. stroke, tumor) of the ipsilateral primary motor cortex (M1) are well-described. Yet their role in compensatory mechanisms remains largely unclear. This dissertation aims to shed light on this prevailing issue in a series of studies including a model in healthy subjects. The opportunity to undertake neurophysiological examinations of PMC properties and M1-PMC-interactions are a premise for studying compensatory mechanisms. Transcranial magnetic stimulation (TMS) is a well-established technique to examine cortical neurophysiological properties. However, its spatial resolution does not suffice PMC investigations. Thus, a first study sought to evaluate whether novel navigated TMS (nTMS) systems provide a sufficient resolution in healthy subjects. A second study examined the interrater and retest reliability in order to grant broad applicability and replication of test results. Finally, a third study examined principles of M1-PMC-interaction, particularly considering compensatory mechanisms related to post-stroke recovery, in a model of artificially induced reversible inhibition of M1 excitability and function in healthy participants.

Methods

The influence of confounding parameters (e.g. physical imprecisions) on fundamental TMS measurements was compared between TMS and nTMS in healthy participants. Furthermore, the validity of the estimated intracortical electric field strengths provided by the nTMS system was established. Extending the investigation to patients with peritumoral tumors, we subsequently studied test-retest and interrater reliability of nTMS. Finally, we examined the role of the PMC in compensating for loss-of-function in M1. In this randomized double-blind sham-controlled crossover design study in healthy subjects we induced an artificial lesion of M1 via cathodal transcranial direct current stimulation (c-tDCS).

Results

nTMS proved to be a reliable tool for neurophysiological studies in healthy subjects and patients. The estimated intracortical induced electric field strengths were

a valid predictor for MEP size. NTMS enabled reliable examinations of premotor corticospinal excitability in healthy subjects. Premotor excitability increased following M1 inhibition and was the only predictor of motor performance.

Conclusion

The present set of studies provides novel evidence that premotor corticospinal projections can be identified and studied with nTMS in healthy subjects. The PMC compensates for attenuated M1 excitability and helps to maintain motor performance. Results thus suggest that the investigation of PMC excitability and premotor corticospinal projections hold the potential to be a useful clinical parameter for estimating and possibly predicting the course and prognosis of post-lesional restitution of motor function.

3 Einführung

Die Ausführung motorischer Handlungen erfordert eine zielgerichtete Interaktion distinkter primär und sekundär motorischer Areale des humanen Neokortex. Hierfür kommt faszilitierenden und inhibitorischen Verbindungen zwischen primär motorischem (M1) und prämotorischem Kortex (PMC) eine besondere Bedeutung zu.¹ Diese sind zudem Grundlage einer komplexen Interaktion zwischen M1 und dem ipsilateralen PMC im Falle einer Läsion von M1 oder dessen subkortikaler Projektionen.² Zeitabhängig ist für diese Interaktion sowohl ein positiver als auch negativer Einfluss auf die Restitution motorischer Funktion beschrieben.² Darüber hinaus zeigen Schlaganfallstudien, dass der PMC potentiell M1-Funktionen übernehmen kann.³ Es ist jedoch ungeklärt, welche neurophysiologischen Mechanismen Grundlage möglicher kompensatorischer und restitutiver Einflüsse des PMC sind. Die Einschätzung wird besonders durch unzureichende Kenntnisse neurophysiologischer Eigenschaften des PMC und der M1-PMC-Interaktion beim Menschen limitiert. So ist insbesondere unklar, ob, wie im Primaten sicher belegt, direkte prämotorische kortikospinale Verbindungen existieren und was ihre Bedeutung für restitutive und kompensatorische Prozesse ist.²⁻⁴

Die transkranielle Magnetstimulation (TMS) ist eine etablierte Methode zur Untersuchung neurophysiologischer Grundlagen im humanen Neocortex und wäre somit geeignet einleitend dargestellte offene Fragen zu Eigenschaften des PMC und der M1-PMC-Interaktion zu beantworten. Der ausgezeichneten zeitlichen Auflösung der konventionellen TMS steht jedoch eine schlechtere räumliche Auflösung als bei bildgebenden Verfahren wie z.B. der Magnetresonanztomographie (MRT) gegenüber. Dies schränkt die gezielte Untersuchung innerhalb prämotorischer Areale und den Nachweis direkter kortikospinaler Verbindungen des PMC auf Grund der räumlichen Nähe zu M1 ein. Die weiterentwickelte neuronavigierte TMS (nTMS) ermöglicht die Stimulation anhand individuell angefertigter anatomischer, meist MRT-basierter, Bilddaten mit einer Genauigkeit von ca. 5 mm auszurichten.⁵ Zudem werden systematische Fehler während der Untersuchung minimiert.⁵ Trotz dieser Fortschritte gelang es jedoch bisher nicht selektiv prämotorische kortikospinale Verbindungen zu identifizieren.^{4,6} Dies kann teilweise dadurch erklärt werden, dass die räumliche Auflösung der TMS durch die Streuung des intrakortikal induzierten elektrischen Feldes in vom Zentrum der Stimulation entfernte Regionen, sogenannte Ferneffekte, weiter reduziert wird. Moderne nTMS-Systeme ermöglichen durch eine Schätzung der

Verteilung dieser Felder eine Kontrolle für Ferneffekte.⁵ Ob die Stärke des geschätzten elektrischen Feldes jedoch auch ein direktes Maß für die biologische Effektstärke der nTMS ist, ist ungeklärt. Dies ist jedoch eine Voraussetzung für eine differenzierte Untersuchung primär und prämotorischer Areale.

Ziel der ersten zwei Studien meiner Dissertation war es daher zunächst die methodischen Voraussetzungen zu schaffen den PMC beim Menschen mittels nTMS zu untersuchen. In einer ersten Studie sollte zunächst die suffiziente räumliche Auflösung der nTMS als auch die zur Differenzierung zwischen M1 und PMC notwendige Validität der Berechnung intrakortikal induzierter elektrischer Feldstärken untersucht werden. Eine zweite Studie diente der Untersuchung der Test-Retest- sowie Interrater-Reliabilität bei Normalprobanden und Patienten als zukünftige Voraussetzung zur breiten Anwendung und Reproduzierbarkeit von Ergebnissen. In einer dritten Studie nutzte ich die Ergebnisse der Vorstudien zur Etablierung eines neuen Kartierungsalgorithmus, um erstmals direkte kortikospinale Projektionen des PMC bei Normalprobanden mittels nTMS zu identifizieren. In einem Anschlussexperiment wurde mittels kathodaler transkranieller Gleichstromstimulation (c-tDCS) ein transientes Läsionsmodell der M1-Erregbarkeit und motorischen Funktion bei Normalprobanden induziert. Die anschließende Untersuchung der konsekutiven Adaptation der PMC-Aktivität sollte Aufschluss über neurophysiologische Mechanismen zur Restitution beeinträchtigter motorischer Fertigkeiten geben.

4 Methodik

In den Abschnitten 4.1 - 4.3 sind Methoden beschrieben, wie sie, sofern nicht explizit anders erwähnt, in allen Studien eingesetzt wurden.

4.1. Navigierte transkranielle Magnetstimulation

Für alle Studienteilnehmer wurden individuelle strukturelle MRT-Aufnahmen angefertigt. Für Patienten wurden diese in klinisch indizierte Bildgebungsprotokolle integriert. Stärke, Ort und Richtung des TMS induzierten elektrischen Feldes wurden durch das nTMS-System geschätzt (eXimia, Nexstim Ltd, Helsinki, Finnland).

4.2. Kartierung

Zu Beginn jeder Untersuchung wurde der Ort innerhalb von M1 identifiziert, an dem ein maximal großes motorisch evoziertes Potential (MEP) mit der

kleinstmöglichen nTMS Stimulationsintensität in einem Zielmuskel ausgelöst werden konnte (*Hotspot*). Dies erfolgte wie etabliert mittels einer systematischen Änderung der Spulendrehung, -kipfung und -lokalisation. Über dem *Hotspot* wurden nachfolgend beschriebene Parameter kortikospinaler und intrakortikaler Erregbarkeit untersucht.

4.3. Kortikospinale, intrakortikale und interhemisphärische Erregbarkeit

Zunächst wurden individuelle Stimulationsstärken (sog. Schwellenwerte) mittels einer etablierten Maximum-Likelihood-Methode bestimmt, welche reproduzierbar ein vergleichbar großes MEP von 50 μ V (sog. Ruhemotorschwelle, RMT), 500 μ V (500 μ V-MT) und 1 mV (1 mV-MT) auslösen. Diese Schwellenwerte wurden anschließend wie publiziert zur Kartierung sowie für etablierte Einzel- und Doppelpulsprotokolle zur Quantifizierung der kortikospinalen Erregbarkeit (sog. Input-Output-Kurven), Hemmung zwischen bilateralen M1 (sog. short-latency interhemispherischen inhibition (IHI)) und intrakortikalen Bahnung und Hemmung in M1 (sog. short-interval intracortical inhibition (SICI) und intracortical facilitation (ICF)) verwendet.⁷

4.4. Studie I: Nicht-physiologische Einflussfaktoren in nTMS-Studien

4.4.1. Probanden

Es wurden 22 gesunde Normalprobanden untersucht (Alter 25 ± 4.31 Jahre, 11 weiblich). 20 Probanden nahmen am Hauptexperiment (E1 und E2) teil. Vier Probanden, wovon zwei nicht am Hauptexperiment teilnahmen, partizipierten in einem Kontrollexperiment (E3). Alle Probanden gaben ihre informierte Einwilligung. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin genehmigt.

4.4.2. Elektrophysiologische Maße und Design

Die Kartierung des primär motorischen Kortex (M1) und die Bestimmung im Folgenden genannter elektrophysiologischer Parameter wurde wie in Kapitel 4.1. - 4.3. beschrieben mittels nTMS durchgeführt. Zusätzlich zum *Hotspot* wurde der „Center of Gravity“ (CoG) wie publiziert berechnet.⁸ Vorinnervation wurde definiert als das Integral des EMG-Signals im Intervall von 100 ms – 0 ms vor einem TMS-Puls. Im ersten Experiment (E1) erhielten zehn Probanden 100 nicht-navigierte TMS-Pulse über der primär motorischen Repräsentation des ersten Musculus interosseus dorsalis manus (FDI) mit willkürlicher Variation der Spulen-Lokalisation und –Orientierung. Im zweiten Experiment (E2) erhielten zehn Probanden 100 navigierte TMS-Pulse über dem CoG des FDI. Die Daten eines Probanden mussten wegen technischer Probleme

in der Navigation von der Auswertung ausgeschlossen werden. In einem Kontrollexperiment (E3) erhielten vier Probanden eine navigierte Stimulation mit modifizierter Vorinnervationstärke (20 Sekunden maximale Vorinnervation; 10 Sekunden Vorinnervation $< 20 \mu\text{V}$).

4.4.3. Signalverarbeitung und Statistik

Die Signalverarbeitung erfolgte mittels Matlab (MATLAB® 2008b, The MathWorks, Gatwick, USA). Die kortikospinale Erregbarkeit wurde als Mittelwert von mindestens 20 TMS-Stimuli definiert. Die CSE-Variabilität wurde mittels Varianzkoeffizienten (CV) angegeben. Anschließend erfolgte eine multivariate schrittweise Regression z-transformierter Daten mit MEP-Amplituden als abhängige Variable sowie den Prädiktoren Spulen-Lokalisation, -Normalenvektor, -Orientierung, Vorinnervation und geschätzte maximale intrakortikal induzierte elektrische Feldstärke (EF_{max} ; siehe auch Kapitel 4.6.3). Die Signifikanz der Korrektur für Einflussfaktoren wurde mittels gepaarten zweiseitigen t-Tests des CV der MEP-Amplituden und des CV der Residuen untersucht. Wir stellten zudem ein einfaches Modell navigierter versus nicht-navigierter Stimulation auf, um die maximale Auflösung der nTMS zu bestimmen. Als Referenzraum wurden Daten der navigierten Stimulation verwendet, welche Schwankungen von 0 - 2 mm aufwiesen. Die Daten der nicht-navigierten Stimulation wurden post-hoc gefiltert, um einen Datenraum (d.h. den maximalen Abstand der Stimulationsorte zum CoG) von 0 – 3 mm, 0 – 4 mm, 0 – 5 mm usw. zu erfassen. Für jedes Datenintervall wurde ein Bootstrapping mit tausendfachem Resampling durchgeführt. In jedem Bootstrap wurden zufällig jeweils 20 MEP-Amplituden aus dem navigierten und aus dem nicht-navigierten Datenraum gezogen und gegeneinander verglichen (einseitiger homoskedastischer t-Test unter der Hypothese, dass im navigierten Datenraum höhere MEP-Amplituden vorliegen).

4.5. Studie II: Die Reliabilität topografischer Messungen

4.5.1. Probanden

Es wurden 10 gesunde Probanden (vier weiblich, medianes Alter 35 Jahre (Spanne: 24-49)) sowie 10 Patienten (drei weiblich, medianes Alter 50 Jahre (Spanne: 21-69)) mit einem nach MRT-Kriterien vermuteten Tumor im oder nahe dem primär motorischen Kortex untersucht. Die Untersuchung der Patienten erfolgte innerhalb einer klinisch indizierten prächirurgischen Evaluation.⁹ Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin genehmigt.

4.5.2. Studiendesign

Die Kartierung des primär motorischen Areals der dominanten Hemisphäre (gesunde Probanden) oder der durch eine Läsion betroffenen Hemisphäre (Patienten) erfolgte durch zwei Untersucher. Ein Untersucher (U1) war in nTMS unerfahren, der zweite Untersucher (U2) sehr erfahren.¹⁰ Eine Kartierung von M1 wurde bei Normalprobanden insgesamt zweimal und bei Patienten einmal nach identischem Protokoll durchgeführt.¹⁰ Die Retest-Reliabilität wurde somit bei Normalprobanden, die Interrater-Reliabilität bei Normalprobanden und Patienten untersucht.

4.5.3. Datenauswertung und Statistik

Räumliche Abstände zwischen *Hotspots* bzw. CoG der einzelnen Untersuchungen wurden in Projektion auf die Kortexoberfläche berechnet. Die Interrater-Reliabilität wurde mittels Intra-Klassen-Korrelation (ICC) und Variationskoeffizienten (CV) untersucht. In einer schrittweisen linearen Regressionsanalyse wurde der Einfluss verschiedener Parameter (Geschlecht, Alter, Art des Probanden (d.h. Normalproband oder Patient), untersuchte Hemisphäre) auf die Messunterschiede beider Untersucher evaluiert. Mittelwertsunterschiede zwischen Untersuchern bzw. Konditionen wurden bei Vergleichen zwischen Probanden mittels ungepaarten t-Tests bzw., falls Daten nicht normalverteilt waren, Mann-Whitney-U-Tests, innerhalb von Probanden mittels gepaarten t-Tests bzw., falls Daten nicht normalverteilt waren, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests getestet.

4.6. Studie III: Entwicklung prämotorischer kortikaler Erregbarkeit nach kathodaler Hemmung des primären Motorkortex

4.6.1. Probanden

Es wurden 16 Probanden eingeschlossen (15 rechtshändig, 4 weiblich, mittleres Alter 25.6 ± 2.3 Jahre). Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin genehmigt.

4.6.2. Design

Jeder Proband nahm an drei Untersuchungssitzungen teil. Zunächst wurde mittels nTMS ein M1- und PMC-*Hotspot* identifiziert. In den folgenden zwei Sitzungen wurde doppelblind und in randomisierter Reihenfolge eine kathodale transkranielle Gleichstromstimulation (c-tDCS) oder Scheinstimulation (sham-tDCS) über dem M1-*Hotspot* der dominanten Hemisphäre appliziert. Direkt vor und nach tDCS wurden

20 TMS-Stimuli mit gleicher Intensität appliziert, um den Stimulationseffekt zu quantifizieren. Darüber hinaus wurden fünf Maße kortikaler Erregbarkeit (ICF, SICI, IHI, Input-Output-Kurven, Schwellenwerte) sowie ein Maß motorischer Funktion (Fingertapping) zufällig auf eine von vier zwanzig Minuten langen Messeinheiten nach der tDCS-Intervention verteilt. Zudem wurde eine frühe (bis 40 Minuten) und eine späte (40 – 80 Minuten) Messphase unterschieden (für Details siehe Seite 50, Abb. 1). IHI, SICI und ICF wurden auf eine gemeinsame Messeinheit verteilt. Die randomisierte Messreihenfolge wurde für einen Probanden für beide tDCS-Konditionen (d.h. sham und kathodal) konstant gehalten (Blockrandomisierung). Die relative Änderung dieser sechs Parameter wurde zwischen Stimulationsbedingungen in einem Within-Subject-Design untersucht.

4.6.3. Primär motorische und prämotorische Kartierung

Die Kartierung von M1 erfolgte wie in Kapitel 4.2. beschrieben. Die PMC-Kartierung für einen *Hotspot* erfolgte wie publiziert entlang anatomischer Leitstrukturen und unter Kontrolle für Ferneffekte innerhalb von M1.⁷

4.6.4. Transkranielle Gleichstromstimulation

Es wurde ein bipolarer Gleichstromstimulator für die tDCS (DS5, Digitimer, Cambridge, Vereinigtes Königreich) verwendet und das Zentrum der länglichen Stimulationselektrode (Größe 6.4 x 2.5 cm) über dem M1-*Hotspot* der dominanten Hemisphäre platziert, um eine Stimulation des angrenzenden PMC zu vermeiden. Die Stromdichte betrug -0.04 mA/cm^2 . Die Stimulationsdauer war wie etabliert 10 Minuten bei c-tDCS und 30 Sekunden bei sham-tDCS.¹¹

4.6.5. Datenauswertung und Statistik

Matlab (MATLAB® 2008b, The MathWorks, Gatwick, USA) wurde für die Signalverarbeitung und statistische Auswertung genutzt. Mittlere MEP-Amplituden vor und nach tDCS wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. Statistische Unterschiede zwischen Messparametern (siehe Kapitel 4.6.2.) der Interventionsgruppen (kathodal oder sham) und MEP-Latenzen zwischen Regionen (M1 oder PMC) wurden mittels univariater mehrfaktorieller ANOVA mit Messwiederholungen getestet. Mittelwerte wurden post-hoc, nach Alpha-Fehler-Korrektur durch die Tukey-Methode, paarweise anhand ihrer 95% Konfidenzintervalle auf statistisch signifikante Unterschiede getestet. Der prädiktive Wert elektrophysiologischer Parameter für die motorische Funktion (Fingertapping) wurde

mittels schrittweiser Regressionsanalyse überprüft. Die Genauigkeit der elektrischen Feldlokalisierung und Stimulusorientierung der M1- und PMC-*Hotspots* wurde durch Bootstrap-Resampling ermittelt.

5 Ergebnisse

5.1. Studie I: Nicht-physiologische Einflussfaktoren in nTMS-Studien

Alle Parameter außer der Spulenkipfung waren in der nicht-navigierten Kondition (E1) mit der MEP-Amplitude assoziiert ($p < 0,05$). In der navigierten Kondition (E2) traf dies auf keinen Parameter zu. Die Vorinnervation ist ein starker Prädiktor der MEP-Amplitude ($p < 0,05$). Bezüglich der Reduktion der Gesamtvarianz (d.h. der Summe aller durch die Prädiktoren aufgeklärten Varianzen) ergab sich auch für E2 ein signifikantes Ergebnis. Die Lokalisation des intrakortikalen elektrischen Feldmaximums und der Spulenlokalisierung auf der Schädeloberfläche erklärten innerhalb des Modells die gleiche Varianz (RMSE E1: 284 ± 184 bzw. 285 ± 185 ; RMSE E2: 703 ± 297 bzw. 710 ± 298). Die retrospektive Analyse von CSE-Bestimmungen ($n = 170$) anderer eigener Studien konnte eine Reduktion des Varianzkoeffizienten um 12,5% verifizieren ($p < 0,05$). Die Partitionierung der Varianz ergab, dass die Schwankungen der CSE-Bestimmung größtenteils auf Fluktuationen der Spulenlokalisierung (36%) und weniger der Spulendrehung ($< 1\%$), -kipfung (5%) oder Stimulationsstärke ($< 1\%$) zurückzuführen waren. Die Untersuchung der räumlichen Auflösung von nTMS durch Bootstrap-Resampling zeigte, dass bereits sehr kleine Veränderungen der Spulenlokalisierung über 2 mm zu signifikanten Veränderungen der CSE-Schätzung führten.

5.2. Studie II: Die Reliabilität topografischer Messungen

Der mediane RMT von U2 bei gesunden Probanden betrug 38% der maximalen Stimulatorleistung (MSO; Spanne: 32 - 47). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der linken und der rechten Hemisphäre ($p = 0,2$). Der mediane Unterschied der RMT zwischen zwei Untersuchungen lag bei 0% MSO (Spanne: -9 – 5). Die Intra-Klassen-Korrelation (ICC) lag bei 0,63. Der mediane Abstand der RMT zwischen den beiden Untersuchern bei gesunden Probanden lag bei 0,5% MSO (Spanne: -6 - 15); die ICC betrug 0,69. Der durch U2 bestimmte mediane RMT für Tumorpatienten betrug 37% MSO (Spanne: 22 – 50) in der gesunden und 37% MSO (Spanne: 21 – 47) in der

durch eine Läsion betroffenen Hemisphäre. Der mediane Unterschied der RMT zwischen beiden Untersuchern betrug 1% MSO (Spanne: -9 – 6) in der gesunden und 2% MSO (-4 – 0) in der erkrankten Hemisphäre. Die ICC zwischen beiden Untersuchern betrug 0,93 für die gesunde und 0,96 für die betroffene Hemisphäre.

Der Test-Retest-Unterschied zwischen den *Hotspots* und CoG bei U1 und U2 lag im Bereich des mittleren gesamten Fehlers des navigierten TMS-Systems bei 5,7 mm; der CV unterschied sich nicht. In einer Regressionsanalyse war keine der unabhängigen Variablen (siehe Kapitel 4.5.3.) ein signifikanter Prädiktor für den Unterschied der CoG zu beiden Untersuchungszeitpunkten. Darüber hinaus war der mittlere Unterschied der CoG zwischen der linken und rechten Hemisphäre nicht statistisch signifikant ($p = 0,17$). Der mittlere Abstand der von beiden Untersuchern bestimmten CoG bei gesunden Probanden bzw. Patienten (1,18 mm größer bei Tumorpatienten) erreichte keine statistische Signifikanz ($p = 0,21$). Zudem bestand kein Unterschied zwischen den durch beide Untersucher erhobenen CoG der linken und rechten Hemisphäre bei gesunden Probanden bzw. der betroffenen und nicht betroffenen Hemisphäre bei Tumorpatienten ($p = 0,17$ bzw. $p = 0,72$). Ein multivariates Regressionsmodell ergab zwei unabhängige Prädiktoren: ein Kraftgrad von 3 auf der Skala des Medical Research Council (im Vergleich zu 5 als Referenz; Koeffizient = -2,44, $p = 0,042$) und eine Raumforderung (Koeffizient = 1,58, $p = 0,093$). Dieses Modell erklärt einen moderaten Anteil der gesamten Datenvarianz ($R^2 = 0,39$).

Der mittlere Abstand der mittels orthogonaler bzw. variabler Spulenorientierung kartierten CoG in beiden Hemisphären aller Probanden betrug 3,87 mm (SE: 0,38; Spanne: 0,00 – 9,23; CV: 0,59).

5.3. Studie III: Entwicklung prämotorischer kortikaler Erregbarkeit nach kathodaler Hemmung des primären Motorkortex

5.3.1. Prämotorische Kartierung

Ein prämotorischer *Hotspot* konnte bei allen Probanden identifiziert werden. Die mittlere Lokalisation war 17,09 mm rostral (95% CI: 14,94 – 18,99 mm) und 14,64 mm medial (95% CI: 12,52 – 16,73 mm) des M1-*Hotspots* auf der Kortexoberfläche. Die optimale Spulenorientierung war signifikant verschieden zwischen beiden *Hotspots* ($4,44^\circ$; 95% CI: $3,44 - 5,38^\circ$). Die MEP Latenzen zwischen PMC ($21,76 \text{ ms} \pm 0,82$) und M1-Stimulation ($22,64 \text{ ms} \pm 0,82$) waren vergleichbar ($-0,88 \text{ ms}$;

95% CI: -1,43 – 3,19 ms; $F_{(1,15)} = 0,58$, $p = 0,45$). Die Ergebnisse unterschieden sich nicht zwischen Muskelgruppen und Zielregionen ($F_{(1,15)} = 0,61$, $p = 0,44$).

5.3.2. Motorische Funktion

Kathodale tDCS hatte einen signifikanten zeitabhängigen Effekt auf die maximale Fingertapping-Frequenz ($F_{(1,15)} = 6,39$, $p = 0,02$). In der frühen Phase waren Probanden nach kathodaler tDCS langsamer als nach Scheinstimulation (11,91%; 95% CI: 2,63 -21,21%). In der späten Phase ergab sich kein Unterschied.

5.3.3. Elektrophysiologische Parameter (M1)

MEP Amplituden waren nach kathodaler tDCS um etwa 50% gegenüber dem Ausgangswert reduziert ($688 \pm 50 \mu\text{V}$ vs. $370 \pm 54 \mu\text{V}$; $F_{(1,15)} = 18,63$, $p < 0,05$). Im Gegensatz dazu ergab sich kein Unterschied nach Scheinstimulation ($732 \pm 46 \mu\text{V}$ vs. $717 \pm 44 \mu\text{V}$; $F_{(1,15)} = 0,06$, $p = 0,8$). Nach kathodaler tDCS war die RMT in der frühen Phase 9,18% höher als in nach Scheinstimulation ($F_{(1,15)} = 6,61$, $p = 0,013$; 95% CI: 0,04 – 18,33%). In der späten Phase ergab sich kein Unterschied. Die Input-Output-Kurven-Analyse erbrachte unter Berücksichtigung der Stimulationsintensität den Nachweis eines zeitabhängigen inhibitorischen Effekts der kathodalen tDCS ($F_{(3,15)} = 3,04$, $p = 0,03$). In der frühen Phase waren MEP-Amplituden nach kathodaler tDCS bei Stimulation mit 130% bzw. 140% RMT um 7,73% (95% CI: 0,32 – 15,15%) bzw. 9,79% (95% CI: 2,74 – 12,73%) niedriger als nach Scheinstimulation. In der späten Phase unterschieden sich die MEP-Amplituden zwischen den Gruppen nicht. Es bestand eine signifikante Interaktion zwischen Interventionsart, Zeit und Interstimulus-Intervall ($F_{(1,15)} = 5,68$, $p = 0,003$). Die SICI war in der frühen Phase nach kathodaler tDCS 32,95% stärker als nach Scheinstimulation (95% CI: 8,91 – 56,99%). Eine signifikante Interaktion zwischen Zeit und Interstimulus-Intervall ($F_{(1,15)} = 10,02$, $p = 0,002$) belegt zudem einen von der Intervention (d.h. kathodal oder sham) unabhängigen Effekt. Die SICI war in der frühen Phase stärker ausgeprägt als in der späten Phase ($-59,77\% \pm 6,11$ vs. $-21,74\% \pm 6,41$, $p < 0,05$). Zudem war die SICI in der späten Phase nach kathodaler Stimulation 28,05% (95% CI: 2,82 – 53,28) schwächer als nach Scheinstimulation. Die ICF wurde weder durch Zeit noch durch die Stimulationsart beeinflusst. Die Stärke der IHI in der dominanten Hemisphäre unterschied sich signifikant zwischen den tDCS Bedingungen ($F_{(1,15)} = 7,01$, $p = 0,01$). Die IHI war in der frühen Phase nach kathodaler tDCS 45,64% (95% CI: 4,4% - 54,93%)

stärker als nach Scheinstimulation. In der späten Phase oder kontralateralen Hemisphäre ergab sich kein signifikanter Unterschied.

5.3.4. Elektrophysiologische Parameter (PMC)

MEP-Amplituden waren in der frühen Phase nach kathodaler tDCS im Vergleich zur Scheinstimulation bei 140% RMT um 25,42% höher ($F_{(3,15)} = 3,19$, $p = 0,03$; 95% CI: 9,92 -49,92%). In der späten Phase traf dies bei 140% und 130% RMT zu (35,6%, 95% CI: 12,39 – 58,82% bzw. 25,19%, 95% CI: 9,07 – 41,32%). Änderungen der prämotorischen RMT waren interventions- und zeitabhängig ($F_{(1,15)} = 5,59$, $p = 0,03$). Die Post-hoc-Analyse erbrachte, dass die prämotorische RMT in der späten Phase 14,15% (95% CI: 1,98 – 26,91%) höher war als nach Scheinstimulation.

5.3.5. Regressionsanalyse

Eine multivariate schrittweise Regression ergab eine signifikante positive Korrelation zwischen MEP-Amplituden, die mit einer Stimulationsintensität von 130% RMT über dem PMC ausgelöst wurden, und der Fingertapping-Leistung (RMSE = 0,99; $R^2 = 0,51$, $p = 0,046$). Andere Parameter primärer oder prämotorischer Erregbarkeit ergaben keinen signifikanten Zusammenhang.

6 Diskussion

Das Ziel meiner Dissertation war es neurophysiologische Kompensationsmechanismen des PMC und der M1-PMC-Interaktion nach künstlich induzierter Hemmung der M1-Erregbarkeit modellhaft zu untersuchen. Die Ergebnisse der hierzu durchgeführten Studien sollten Aufschlüsse über Grundlagen der Aktivitätsänderung prämotorischer Areale nach M1-Läsionen, z.B. nach Schlaganfall, geben.

Das Nutzungspotential der nTMS für diese Untersuchung wurde in den ersten zwei Studien getestet. Hier konnte gezeigt werden, dass die nTMS gegenüber der konventionellen TMS physikalisch bedingte Varianz signifikant reduziert und die räumliche Auflösung verbessert. Die Schätzung der intrakortikalen Feldverteilung ist zudem valide. Darüber hinaus ergaben sich Belege dafür, dass nTMS basierte Untersuchungsparameter bei Normalprobanden und Patienten lediglich eine geringe Intra- und Inter-Untersucher-Varianz aufweisen.

In einer dritten Studie konnten unter diesen Voraussetzungen erstmals direkte kortikospinale Verbindungen des prämotorischen Kortex beim Menschen

nachgewiesen werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass nach Hemmung des ipsilateralen primär motorischen Kortex kompensatorisch die Erregbarkeit des PMC gesteigert ist. In einem Regressionsmodell war die prämotorische Erregbarkeit signifikanter Prädiktor für motorische Fertigkeiten.

6.1. Reduktion der physiologischen und physikalischen Varianz motorisch evozierter Potentiale mittels navigierter TMS

Der kleinste räumliche Varianzkoeffizient für MEP wurde in einer Studie von Brasil-Neto et al. bei Schwankungen der Spulenlokalisierung von 0,5 cm nachgewiesen, womit die räumliche Auflösung von TMS mit 0,5 cm angenommen wurde.¹² Ergebnisse der ersten Studien belegen, dass die Auflösung von TMS sogar bei 2 mm liegt. Die Studie von Brasil-Neto et al. hatte jedoch durch das Studien-Design bedingt einen Ceiling-Effekt und konnte eine geringere Auflösung als 5 mm nicht nachweisen.¹²

Ergebnisse der ersten Studie zeigen zudem, dass mehrere physikalische (Spulenlokalisierung, -kipfung und -orientierung) sowie physiologische (Vorinnervation) Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die Variabilität von MEP haben. Erstmals konnte so belegt werden, dass diese Einflüsse auch für neuronavigierte TMS zutreffen, jedoch gegenüber nicht-navigierten Verfahren minimiert sind. Darüber hinaus konnte die MEP-Varianz rechnerisch mithilfe linearer Regression post-hoc weiter reduziert werden. Diese Erkenntnisse geben ein Erklärungsmodell für diskrepante Untersuchungsbefunde in der Literatur und gewährleisten in künftigen Studien eine deutlich bessere Schätzung der wahren kortikalen Erregbarkeit im motorischen System.

Die Genauigkeit der nTMS hängt ebenfalls von der Schätzung der Verteilung des magnetisch induzierten intrakortikalen elektrischen Feldes ab. Aufgrund individuell verschiedener Dielektrizitätskonstanten des stimulierten Gewebes können interindividuelle Unterschiede bestehen,¹³ die jedoch möglicherweise für die nTMS keinen relevanten Einfluss haben.⁵ Diese Studie belegt erstmals, dass die geschätzte intrakortikale elektrische Feldstärke ein valider Prädiktor für die MEP-Variabilität ist. Somit eröffnet sich die Möglichkeit auch unmittelbar angrenzende Regionen wie z.B. den prämotorischen und primär motorischen Kortex selektiv unter Kontrolle der regionalen physiologischen Effektstärke mittels nTMS zu untersuchen.

Mehrere dieser Studie zu Grunde liegenden notwendigen Annahmen müssen bei der Interpretation der Ergebnisse limitierend berücksichtigt werden. Die zufällige

Verteilung der Stimuli innerhalb des primär motorischen Kortex erfolgte pseudorandomisiert durch einen Untersucher. Es ist jedoch anzunehmen, dass die pseudorandomisierte Stimulation die Anwendung im klinischen und Forschungsgebrauch suffizient widerspiegelt. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung mittels linear unabhängiger Prädiktoren auf Grundlage eines Sphärenmodells. Die Prädiktoren könnten jedoch in einem nicht-linearen Modell, das genauere räumliche Informationen verwendet (z.B. finite elements models), voneinander abhängig und ihr Einfluss auf den Stimulationseffekt divergent sein. Dies könnte insbesondere für Probanden mit veränderter lokaler Anatomie sowie komplexer Zusammensetzung der Gewebeleitfähigkeit (z.B. nach Schlaganfall) zutreffen. Das Ziel dieser Studie war jedoch den Einfluss physikalischer Parameter in einer für gegenwärtige klinische und angewandte Forschung typischen Umgebung zu untersuchen und die Analyse sowie Interpretation von Ergebnissen dieser Studien zu optimieren.

6.2. Intra- und Interrater-Reliabilität navigierter Hirnstimulation bei Normalprobanden und Patienten mit perirolandischen Tumoren

Die transkranielle Magnetstimulation ist seit einem Vierteljahrhundert für neurowissenschaftliche und klinische Untersuchungen verfügbar. Obwohl sich mittels TMS zuverlässig MEP auslösen lassen, war auf Grund der limitierten räumlichen Auflösung die intraoperative direkte kortikale Stimulation (DCS) weiterhin Goldstandard für die räumliche Untersuchung von Projektionen des kortikospinalen Traktes im Rahmen neurochirurgischer Interventionen (z.B. Tumorresektion). In der ersten Studie dieser Dissertation konnte bereits gezeigt werden, dass die nTMS eine höhere räumliche Auflösung als angenommen bietet. In Kooperation mit der Klinik für Neurochirurgie konnte unsere Gruppe kürzlich zeigen, dass mittels neuronavigierter TMS im klinischen Kontext eine Genauigkeit der nicht-invasiven Untersuchung erreicht werden kann, die der einer DCS vergleichbar ist.⁹

Ergebnisse der zweiten Studie dieser Dissertation zeigen, dass zudem eine suffiziente Inter- und Intrarater Reliabilität besteht. Dies ist eine Voraussetzung für den multizentrischen und benutzerunabhängigen Einsatz der nTMS in Neurochirurgie und neurowissenschaftlicher Forschung. Insbesondere lagen die mittleren Abstände der verglichenen Mittelwerte der *Hotspots* und der CoG zwischen den Untersuchern bzw. zu mehreren Zeitpunkten eines Untersuchers unterhalb der maximalen

systeminhärenten Auflösung im klinischen Einsatz.⁵ Der geringe Standardfehler der erhobenen Mittelwerte (< 0,5 mm) belegt, dass die gemessenen und untersuchten Mittelwerte sowie deren Abstände nahe an den wahren Messunterschieden des Systems liegen. Bemerkenswert ist, dass die Abstände der CoG bei Patienten mit Läsionen der Zentralregion geringer waren als die der *Hotspots*. Der CoG scheint somit weniger anfällig für Fluktuationen physikalischer und physiologischer Einflussfaktoren (z.B. Patientenbewegungen, schwankende Vorinnervation der spastischen Extremität) als der *Hotspot* zu sein. Bei Normalprobanden ließ sich dieser Effekt nicht ableiten. Somit scheint bei der Untersuchung von Normalprobanden die Verwendung des *Hotspots* mit der des CoG äquivalent. Bei der Untersuchung von Patienten sollte die Bestimmung des *Hotspots* jedoch mit größerer Sorgfalt und ausführlicher Kartierung erfolgen, um den Einfluss von Fluktuation der Erregbarkeit zu minimieren.

6.3. Adaption prämotorischer Erregbarkeit nach künstlicher Hemmung der primär motorischen Erregbarkeit sowie deren Bedeutung für die Restitution einfacher motorischer Fertigkeiten

Die Hauptergebnisse der dritten Studie sind, dass I) nach c-tDCS induzierter Hemmung des ipsilateralen primär motorischen Kortex die Erregbarkeit des prämotorischen Kortex steigt, II) die Änderung der prämotorischen Erregbarkeit länger andauert als die Hemmung der primär motorischen Erregbarkeit, und III) dass die Erregbarkeit des PMC bei 130% RMT ein signifikanter Prädiktor für eine einfache motorische Fertigkeit ist.

Die Elektrodenkonfiguration (16 cm² statt 35 cm² Stimulationselektrode; Anordnung mit der Längachse parallel zum Sulcus centralis) und Stromstärke (0.7 mA statt 1 mA) wichen von üblichen Parametern zur tDCS induzierten primär motorischen Hemmung ab.¹¹ Auch mit dem modifizierten Design wurden etablierte Effektgrößen der kathodalen tDCS auf MEP-Amplituden, SICI und RMT induziert.¹¹ Die ICF war nicht wie in klassischen Modellen reduziert. Dies ist am ehesten einer fokaleren Stimulation mit Affektion unterschiedlicher Neuronenpopulationen innerhalb von M1 geschuldet.¹⁴

In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der prämotorische Kortex einer nicht-invasiven Hirnstimulation mittels Einzelpuls-TMS und plastizitäts-induzierenden Verfahren zugänglich ist.^{1,4,14} In dieser Studie gelang es erstmals selektiv direkte kortikospinale Verbindungen des prämotorischen Kortex zu Alpha-

Motoneuronen mittels nTMS zu identifizieren und zu untersuchen. Eine indirekte Aktivierung von PMC-M1-Verbindungen mit konsekutiver Aktivierung primär motorischer Efferenzen ist auf Grund gleicher Latenzzeiten zwischen den aus beiden Regionen abgeleiteten MEP ausgeschlossen, da synaptische Überleitungszeiten die Latenz indirekt generierter MEP signifikant verlängern würden. Darüber hinaus wurde für Ferneffekte des intrakortikal induzierten elektrischen Feldes innerhalb von M1 während der Untersuchung prämotorischer Areale kontrolliert. Dieses Vorgehen könnte durch eine inadäquate Abschätzung der Feldstärkeverteilung in den Sulci limitiert sein, so dass nicht ausgeschlossen ist, dass dort höhere Feldstärken erreicht wurden.¹³ Diese könnten primär motorische Efferenzen von Repräsentationen mit niedrigerer Erregungsschwelle als diejenige unseres Zielmuskels (d.h. des Musculus abductor pollicis) aktivieren und die EMG-Ableitung mit Oberflächenelektroden durch Potentiale dieser Muskelgruppen konfundieren (sog. *volume conduction*). Eine Koaktivierung primär motorischer Efferenzen kann jedoch nicht deutlich divergierende Effekte der kathodalen tDCS auf die Erregbarkeit der Projektionen beider Zielregionen (d.h. PMC und M1) erklären.

Zusammenfassend gelang es in dieser Studie erstmals den Effekt einer Hemmung der primär motorischen Aktivität auf die prämotorische Erregbarkeit direkt zu untersuchen. Bisherige Studien untersuchten Verbindungen zwischen dem PMC und M1 mittels nicht-invasiver Modulation der prämotorischen Erregbarkeit.^{1,14} Diese fanden sowohl bahnende als auch hemmende Verbindungen zwischen beiden Regionen. Eine Erhöhung der prämotorischen Erregbarkeit führte bei Boros et al. zu einer Verminderung der intrakortikalen primär motorischen Hemmung (SICI).¹⁴ Auch in der vorliegenden Studie war eine Erhöhung der prämotorischen Erregbarkeit mit einer reduzierten SICI assoziiert, jedoch erst im späten Untersuchungsintervall. Ein früher Effekt der prämotorischen Erregbarkeitserhöhung auf die SICI wurde wahrscheinlich durch eine direkte Verstärkung der SICI durch die kathodale tDCS maskiert.¹¹ Dieser Anhalt für einen bahnenden Einfluss wird durch einen positiven Zusammenhang der prämotorischen Erregbarkeit mit der primär motorischen Funktion deutlich. Die Erregbarkeit prämotorischer Efferenzen war zudem der einzige signifikante Prädiktor motorischer Funktion.

Es bleibt unklar, ob die nachgewiesenen neurophysiologischen Mechanismen auf kompensatorische und restitutive Vorgänge nach Läsionen von M1 übertragen werden können. So ist zwar gezeigt, dass elektrophysiologische Mechanismen im

Stadium der Diaschisis den strukturellen Kompensationsmechanismen zunächst überwiegen und strukturelle Veränderungen bahnen,¹⁵ womit der prämotorische Kortex ein mögliches Ziel für plastizitätsinduzierende nicht-invasive Hirnstimulationsverfahren im Rahmen der Neurorehabilitation wäre. Diese Einschätzung ist jedoch durch die verschiedenartigen Mechanismen limitiert, die zwischen einer tDCS-induzierten LTD- (*long-term depression*) artigen und ischämisch bedingten Hemmung der primär motorischen Aktivität bestehen,¹⁵ so dass sich auch Kompensationsmechanismen unterscheiden könnten. Ein notwendiger Vergleich sollte in Folgestudien bei Patienten mit akuter Läsion des primär motorischen Areals durchgeführt werden.

6.4. Zusammenfassung

Die Ergebnisse der für diese Dissertation durchgeführten Studien belegen erstmals, dass mittels neuronavigierter TMS intrakortikal induzierte elektrische Felder valide geschätzt werden können und somit die Untersuchung prämotorischer kortikospinaler Projektionen ermöglicht wird. Zudem kann die Messung der Integrität dieser Verbindungen als möglicher neuer Verlaufs- und Prognoseparameter für Patienten mit Läsionen des primär motorischen Systems abgeleitet werden. Die Daten unterstützen, dass sich dieser Parameter mittels navigierter Hirnstimulation untersucherunabhängig und im zeitlichen Verlauf zuverlässig erheben ließe.

7 Referenzen

1. Munchau A, Bloem BR, Irlbacher K, Trimble MR, Rothwell JC. Functional connectivity of human premotor and motor cortex explored with repetitive transcranial magnetic stimulation. *JNeurosci* 2002;22(2):554-61.
2. Rehme AK, Eickhoff SB, Wang LE, Fink GR, Grefkes C. Dynamic causal modeling of cortical activity from the acute to the chronic stage after stroke. *Neuroimage* 2011;55(3):1147-58.
3. Dancause N. Vicarious function of remote cortex following stroke: recent evidence from human and animal studies. *Neuroscientist* 2006;12(6):489-99.
4. Teitti S, Maatta S, Saisanen L, Kononen M, Vanninen R, Hannula H, et al. Non-primary motor areas in the human frontal lobe are connected directly to hand muscles. *Neuroimage* 2008;40(3):1243-50.
5. Ruohonen J, Karhu J. Navigated transcranial magnetic stimulation. *NeurophysiolClin* 2010;40(1):7-17.

6. Fink GR, Frackowiak RS, Pietrzyk U, Passingham RE. Multiple nonprimary motor areas in the human cortex. *JNeurophysiol* 1997;77(4):2164-74.
7. Schmidt S, Fleischmann R, Bathe-Peters R, Irlbacher K, Brandt SA. Evolution of premotor cortical excitability after cathodal inhibition of the primary motor cortex: a sham-controlled serial navigated TMS study. *PLoS one* 2013;8(2):e57425.
8. Schmidt S, Bathe-Peters R, Fleischmann R, Ronnefarth M, Scholz M, Brandt SA. Nonphysiological factors in navigated TMS studies; Confounding covariates and valid intracortical estimates. *Human brain mapping* 2014:n/a-n/a.
9. Picht T, Schmidt S, Brandt S, Frey D, Hannula H, Neuvonen T, et al. Preoperative functional mapping for rolandic brain tumor surgery: comparison of navigated transcranial magnetic stimulation to direct cortical stimulation. *Neurosurgery* 2011;69(3):581-8; discussion 8.
10. Zdunczyk A, Fleischmann R, Schulz J, Vajkoczy P, Picht T. The reliability of topographic measurements from navigated transcranial magnetic stimulation in healthy volunteers and tumor patients. *Acta Neurochir (Wien)* 2013;155(7):1309-17.
11. Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, et al. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimul* 2008;1(3):206-23.
12. Brasil-Neto JP, Cohen LG, Panizza M, Nilsson J, Roth BJ, Hallett M. Optimal focal transcranial magnetic activation of the human motor cortex: effects of coil orientation, shape of the induced current pulse, and stimulus intensity. *J Clin Neurophysiol* 1992;9(1):132-6.
13. Thielscher A, Kammer T. Linking Physics with Physiology in TMS: A Sphere Field Model to Determine the Cortical Stimulation Site in TMS. *Neuroimage* 2002;17(3):1117-30.
14. Boros K, Poreisz C, Munchau A, Paulus W, Nitsche MA. Premotor transcranial direct current stimulation (tDCS) affects primary motor excitability in humans. *EurJNeurosci* 2008;27(5):1292-300.
15. Witte OW, Bidmon HJ, Schiene K, Redecker C, Hagemann G. Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. *JCerebBlood Flow Metab* 2000;20(8):1149-65.

8 Anteilserklärung

„Ich, Robert Fleischmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

„Restitution motorischer Funktion durch Adaption prämotorischer kortikaler Erregbarkeit nach künstlich induzierter reversibler Hemmung des primär motorischen Areal.

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum, 10.07.2015

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Herr Robert Fleischmann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Schmidt S, Bathe-Peters R, Fleischmann R, Rönnefarth M, Scholz M, Brandt SA. Nonphysiological factors in navigated TMS studies; Confounding covariates and valid intracortical estimates. Human brain mapping 2014: [Epub ahead of print].

Die Idee zur Durchführung der Studie entstand in der Diskussion zwischen Dr. Sein Schmidt und dem Promovenden im Rahmen möglicher Limitationen bei der Durchführung der geplanten Studie zur Untersuchung prämotorischer kortikospinaler Bahnen mittels navigierter TMS (Publikation 3). Das Versuchsdesign zur Untersuchung der Validität der navigierten TMS wurde daraufhin von Dr. Sein Schmidt erdacht. Die Studiendurchführung erfolgte gemeinsam durch Dr. Sein Schmidt, den Promovenden, Maria Rönnefahrt und Rouven Bathe-Peters. Die Datenaufbereitung und –auswertung erfolgte durch Dr. Sein Schmidt und Dr. Michael Scholz. Die Besprechung und Interpretation der Studienergebnisse erfolgte gemeinsam zwischen Dr. Sein Schmidt, Dr. Michael Scholz, den Promovenden und Prof. Stephan Brandt. Ein erster Entwurf des Manuskripts wurde durch Dr. Sein Schmidt und Maria Rönnefahrt verfasst. Revisionen des Manuskripts erfolgten durch den Promovenden, Rouven Bather-Peters und Prof. Stephan Brandt. Die finale Version des Manuskripts wurde vor Einreichung durch alle Autoren revidiert und in der publizierten Form akzeptiert.

Publikation 2:

Zdunczyk A*, Fleischmann R*, Schulz J, Vajkoczy P, Picht T. The reliability of topographic measurements from navigated transcranial magnetic stimulation in healthy volunteers and tumor patients. *Acta Neurochir (Wien)* 2013;155(7):1309-17.

(*equal contribution, arbitrary order)

Die Idee zur Durchführung der Studie entstand zwischen den Koautoren und Dr. Thomas Picht auf Grundlage einer bereits in Kooperation der Arbeitsgruppen von Prof. Stephan Brandt (Neurologie) und Dr. Thomas Picht (Neurochirurgie) durchgeführten Studie zur Validität der neuronavigierten TMS. Prof. Stephan Brandt willigte in die Durchführung eines erneuten Kooperationsprojekts ein. Die Erstautoren erdachten gemeinsam das Versuchsdesign zum Nachweis der Reliabilität des Verfahrens bei Normalprobanden und Patienten. Das Design wurde gemeinsam zwischen den Erstautoren, Prof. Peter Vajkoczy und Dr. Thomas Picht diskutiert und angepasst. Die Versuchsdurchführung erfolgte, wie im Versuchsdesign vorgesehen, durch Anna Zdunczyk und Dr. Thomas Picht. Die Datenaufarbeitung erfolgte durch die Erstautoren und Juliane Schulz. Die Datenberechnung erfolgte durch den Promovenden. Die

Datenauswertung erfolgte gemeinsam durch die Erstautoren und Dr. Thomas Picht. Ein Entwurf des Manuskripts wurde durch die Erstautoren geschrieben. Revisionen erfolgten durch Dr. Thomas Picht und Prof. Peter Vajkoczy. Alle Autoren revidierten die abschließende Version des Manuskripts und willigten in die Veröffentlichung in dieser Form ein.

Publikation 3:

Schmidt S*, Fleischmann R*, Bathe-Peters R, Irlbacher K, Brandt SA. Evolution of premotor cortical excitability after cathodal inhibition of the primary motor cortex: a sham-controlled serial navigated TMS study. PloS one 2013;8(2):e57425.

(*equal contribution, arbitrary order)

Die Idee zur Durchführung eines Experiments zur Untersuchung prämotorischer kortikospinaler Verbindungen sowie deren Adaptation nach Inhibition primär motorischer Verbindungen wurde im Rahmen einer Laborbesprechung durch Dr. Sein Schmidt und den Promovenden aufgebracht. Durch den Promovenden wurde ein experimentelles Design zur Überprüfung der Hypothese formuliert, dass neurophysiologische Veränderungen innerhalb des prämotorischen Kortex mittels nicht-invasiver Hirnstimulation untersuchbar sind und kompensatorische Eigenschaften nach Hemmung des primär motorischen Kortex widerspiegeln. Das Versuchsdesign wurde mit Prof. Stephan Brandt in mehreren Treffen besprochen und wiederholt durch den Promovenden angepasst. Die Programmierung der Untersuchungs- und Randomisierungssoftware wurde vollständig durch den Promovenden realisiert. Eine kritische Kontrolle des Programmcodes (Spike2, MATLAB®) erfolgte durch Dr. Sein Schmidt und Rouven Bathe-Peters. Die Rekrutierung und Untersuchung aller Probanden erfolgte durch den Promovenden. Zur Datenanalyse programmierten die Erstautoren eine eigene Matlab-basierte Software (h_NBS.m), die sowohl für die Datenverwaltung als auch –auswertung verwendet wurde. Die statistischen Methoden wurden gemeinsam diskutiert und ausgewählt. Die Durchführung der Datenauswertung erfolgte durch den Promovenden. Die Einschätzung und Diskussion der Ergebnisse erfolgte gemeinsam durch den Promovenden, Dr. Sein Schmidt und Dr. Kerstin Irlbacher. Der erste Entwurf des Manuskripts wurde durch den Promovenden verfasst. Der Entwurf wurde mehrfach

kritisch durch Dr. Sein Schmidt und Prof. Stephan Brandt revidiert und von dem Promovenden angepasst. Der abschließende Entwurf wurde gemeinsam von Dr. Sein Schmidt, Rouven Bathe-Peters und dem Promovenden auf Konsistenz, Verständlichkeit und Fehlerfreiheit überprüft. Die finale Version des Manuskripts wurde vor Einreichung durch alle Autoren revidiert und in der publizierten Form akzeptiert.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

9 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

9.1. Publikation I

<http://dx.doi.org/10.1002/hbm.22611>

9.2. Publikation II

<http://dx.doi.org/10.1007/s00701-013-1665-5>

9.3. Publikation III

OPEN ACCESS Freely available online



Evolution of Premotor Cortical Excitability after Cathodal Inhibition of the Primary Motor Cortex: A Sham-Controlled Serial Navigated TMS Study

Sein Schmidt¹, Robert Fleischmann¹, Rouven Bathe-Peters, Kerstin Irlbacher, Stephan A. Brandt*

Department of Neurology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Abstract

Background: Premotor cortical regions (PMC) play an important role in the orchestration of motor function, yet their role in compensatory mechanisms in a disturbed motor system is largely unclear. Previous studies are consistent in describing pronounced anatomical and functional connectivity between the PMC and the primary motor cortex (M1). Lesion studies consistently show compensatory adaptive changes in PMC neural activity following an M1 lesion. Non-invasive brain modification of PMC neural activity has shown compensatory neurophysiological aftereffects in M1. These studies have contributed to our understanding of how M1 responds to changes in PMC neural activity. Yet, the way in which the PMC responds to artificial inhibition of M1 neural activity is unclear. Here we investigate the neurophysiological consequences in the PMC and the behavioral consequences for motor performance of stimulation mediated M1 inhibition by cathodal transcranial direct current stimulation (tDCS).

Purpose: The primary goal was to determine how electrophysiological measures of PMC excitability change in order to compensate for inhibited M1 neural excitability and attenuated motor performance.

Hypothesis: Cathodal inhibition of M1 excitability leads to a compensatory increase of ipsilateral PMC excitability.

Methods: We enrolled 16 healthy participants in this randomized, double-blind, sham-controlled, crossover design study. All participants underwent navigated transcranial magnetic stimulation (nTMS) to identify PMC and M1 corticospinal projections as well as to evaluate electrophysiological measures of cortical, intracortical and interhemispheric excitability. Cortical M1 excitability was inhibited using cathodal tDCS. Finger-tapping speeds were used to examine motor function.

Results: Cathodal tDCS successfully reduced M1 excitability and motor performance speed. PMC excitability was increased for longer and was the only significant predictor of motor performance.

Conclusion: The PMC compensates for attenuated M1 excitability and contributes to motor performance maintenance.

Citation: Schmidt S, Fleischmann R, Bathe-Peters R, Irlbacher K, Brandt SA (2013) Evolution of Premotor Cortical Excitability after Cathodal Inhibition of the Primary Motor Cortex: A Sham-Controlled Serial Navigated TMS Study. PLoS ONE 8(2): e57425. doi:10.1371/journal.pone.0057425

Editor: Friedemann Paul, Charité University Medicine Berlin, Germany

Received: September 3, 2012; **Accepted:** January 22, 2013; **Published:** February 21, 2013

Copyright: © 2013 Schmidt et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Supported by the DFG grant IR 48/1-1 and the Bernstein Center for Computational Neuroscience Berlin (BCCN). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: stephan.brandt@charite.de

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

The human motor system comprises distinct primary (M1) and secondary motor areas. Strong interconnections orchestrate interactions relevant to everyday activities [1,2]. Artificial modulation or pathological alteration of any part can induce changes in network activity and underlying electrophysiological properties with consequences for proper motor functioning [3–6]. In general, functionally significant adaptations in premotor areas (PMC) after M1 lesions are well established in both animals [7] and humans [5,7–10]. In macaque monkeys it has been shown that transient pharmacological PMC inhibition following functional recovery after ibotenic acid M1 lesions severely inhibited motor performance [11]. A similar effect can be observed in humans: inhibition

of the ipsi- or contralesional dorsal PMC after M1 ischemic lesions inhibits motor performance [8,12]. Furthermore, functional imaging studies confirm that behavioral compensation after M1 lesions depends strongly on the PMC activity [11,13,14].

Thus, several non-invasive brain stimulation studies have specifically investigated the relationship between PMC and M1 regions after single-pulse, inhibitory or facilitatory stimulation of the PMC to disclose the electrophysiological properties of interregional pathways mediating aforementioned effects [15–21]. The studies have consistently found strong connectivity between the PMC and M1 regions. The results strongly suggest the existence of a pathway targeting an interneuron network within M1 facilitating its corticospinal output. Other studies have established the behavioral consequences of M1 inhibitory stimu-

lation for motor performance [4,6,14] and interhemispheric interactions between bilateral primary motor areas [19,22]. Finally, lesion studies in animals and humans have consistently shown the significant role that the PMC plays in compensating for lost M1 functionality. In contrast, the compensatory changes in the PMC following the artificial inhibition of M1 neural activity and the behavioral consequences remain to be investigated. The structural basis for compensatory interactions can be found in (1) the vast array of interconnections between M1 and the PMC as well as in (2) corticospinal output neurons within the PMC [21].

Many aspects of the significance of the association between the PMC and M1 regions remain unresolved [18,23,24]. For example, Johansen-Berg et al. find that post-stroke motor performance depends on PMC activity in the contralesional hemisphere [25] while Fridman et al. provide evidence that ipsilesional PMC activation is beneficial and that contralesional regions make no substantial contribution [26]. Yet, Nelles et al. report that ipsilesional PMC activity can be either beneficial or disadvantageous [27]. A possible reason for these divergent findings could be that the amount of deficit plays a critical role in a time-dependent manner [5,7,12].

Swayne et al., based on lesion data obtained from stroke patients, proposed a multistage model of motor network compensation [23]. The model suggests that ipsilateral premotor function can only sufficiently compensate for lost M1 functionality in cases of mild impairment. Stepwise processes can recruit contralateral motor areas depending on the amount of deficit [5]. Similarly, a recent study also performed on stroke patients by Rehme et al. has shown how non-affected primary and secondary motor regions change their interaction patterns, i.e. facilitatory or inhibitory, over time [10]. This being said, evidence for time-dependency following non-invasive brain stimulation has also been found in a study on healthy test subjects by Lang et al. [28]. They investigated the temporal dynamics of tDCS induced net aftereffects in and between the bilateral primary motor cortices. They show that the aftereffects on interhemispheric inhibition and the intracortical excitability are time-dependent since local intracortical measures outlast changes in interhemispheric transmission [19]. Despite general similarities, clearly the underlying mechanisms must be assumed to be at least partially different to those seen in lesion studies since the timescale and intervention strength of tDCS does not allow for structural changes [29].

In summary, studies on patients clearly suggest there is an adaptation of the ipsilesional PMC to an M1 lesion that has significant behavioral consequences. However, it remains unclear whether the adaptation is beneficial or disadvantageous. Pathways with different impacts on M1 excitability have been identified in brain stimulation studies. Knowledge of these pathways is relevant to understanding the aforementioned M1-PMC interactions after an M1 lesion. However, the response of M1 and PMC pathways to systematically modified M1 excitability has not been studied. Moreover, none of these studies have related their electrophysiological findings to measures of motor function. Thus, our primary objective was to inhibit M1 neural activity and to study the effect this intervention has on PMC excitability, M1-PMC interaction, and motor performance in healthy test subjects. To address changes in intracortical circuitry and cortical excitability we focused on paired-pulse and input-output TMS protocols. To address the temporal dynamics, in line with a multistage hypothesis, we compared split-half results from a well-established 0 to 40 with a 40 to 80 minute 'late-phase' time window. Motor performance was measured by finger-tapping speed. We found that cathodal tDCS inhibition of M1 leads to enhanced PMC excitability associated with changes in motor performance.

Methods

Ethics approval

This study was approved by the Ethics Commission of the Charité Universitätsmedizin - Berlin and conformed to the *Declaration of Helsinki*. All participants provided written informed consent for the experimental procedure.

Participants

We enrolled 16 participants, 15 right-handed, 1 left-handed (laterality index -90), 4 female, mean age 25.6 ± 2.3 years, and took a detailed medical history to exclude neurological or psychiatric illness and the presence of implanted electronic devices or ferromagnetic metals. Handedness was confirmed by the Edinburgh handedness inventory.

Design

All of the participants took part in three experimental sessions. All of the sessions took place at approximately the same time of day and the participants were asked to have had a sufficient night's rest before the experiments were conducted since the time spent awake has recently been shown to possibly affect susceptibility to non-invasive brain stimulation [30]. First, we performed navigated transcranial magnetic stimulation (nTMS) to determine the optimal stimulation site for M1 and PMC corticospinal projections in the dominant hemisphere. This was performed in an isolated session prior to the two tDCS stimulation sessions to avoid fatigue effects. The coordinates of the two stimulation targets were stored for use in following sessions. In the two subsequent stimulation sessions, sham and cathodal tDCS were applied over M1 individually in each subject. The order was randomized to avoid sequence effects. Both the participants and the investigator were unaware of the stimulation condition (double-blind design). The investigator was blinded by providing a numerical code which had to be entered to the stimulation software and was decoded into the stimulation type (Spike2, CED, Cambridge, UK). Additionally, the display of the stimulation device was covered. Immediately before and after tDCS, 20 TMS stimuli were applied at equal intensities (%MSO, i.e. percentage of maximum stimulator output) at 500 μ V-MT (please refer to the section '*Corticospinal, intracortical and interhemispheric excitability*' for a detailed definition of '500 μ V-MT') before tDCS to examine changes in cortical excitability induced by the stimulation.

Additionally, five measures of cortical excitability and motor function were each randomly assigned to one of four twenty-minute time slots distributed over an early (up to 40 minutes post-tDCS) and late (40–80 minutes post-tDCS) recording period. Two of these measures, interhemispheric inhibition and intracortical excitability (i.e. intracortical facilitation and inhibition), were assigned a common slot. The remaining three measures were input-output curves, motor thresholds, and finger-tapping speed (FT) (see Figure 1). The random order was kept constant in both tDCS conditions (sham versus verum) for each subject (i.e. stratified randomization). Overall, each electrophysiological and functional parameter was investigated on 8 occasions per time interval (i.e. early or late) and condition. We expected to capture all tDCS-induced aftereffects within 80 minutes [31]. Previous work indicates that the duration of tDCS-induced aftereffects varies among different measures of intracortical and interhemispheric excitability [19,22]. The relative change across these five parameters in the post stimulation period was compared between stimulation conditions in a within subject design (repeated measures analysis of variance (ANOVA)).

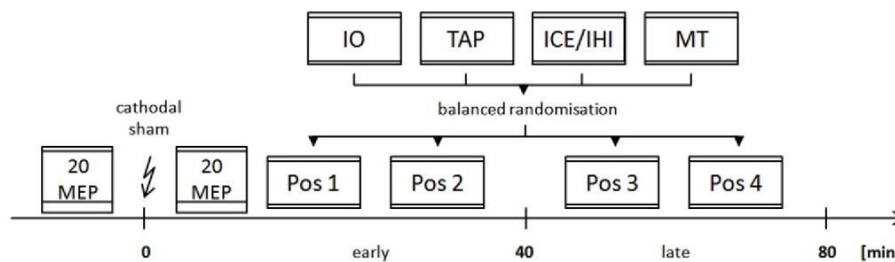


Figure 1. Diagram illustrating the randomization of parameters to be examined in one exemplary subject. Parameters of motor cortical excitability and function were assessed at two time intervals (early or late) following transcranial direct current stimulation (indicated by a flash symbol). Changes in measures recorded 0–40 minutes after discontinuation of the stimulation were considered to be due to early aftereffects. Changes recorded in the successive 40 minutes were considered to be due to late aftereffects. Aftereffects which occurred in only one recording period were considered to be short-lasting; others were considered to be long-lasting. Immediately before and after tDCS, 20 stimuli were applied at a fixed intensity (see methods section for details) over M1 to examine tDCS-induced changes of corticospinal excitability. Afterwards, the five neurophysiological or functional parameters being evaluated were randomly assigned to one of four time slots in the overall 80-minute post-stimulation period. IO = input-output curve, TAP = finger-tapping, ICE = intracortical excitability (Short-interval intracortical inhibition (SICI) and intracortical facilitation (ICF), IHI = interhemispheric inhibition, MT = motor threshold; Pos1 – Pos4: Random position in time for each parameter. doi:10.1371/journal.pone.0057425.g001

Finger tapping

The participant's dominant hand rested on a custom-built copper board that enabled index finger tapping with minimal effort and no mechanical resistance. Participants were instructed to start with and maintain a maximum tapping frequency for 30 seconds for the duration of the trial. Trials were started with a visual cue.

Navigated transcranial magnetic stimulation (nTMS)

Individual structural MRI (3D-MPRAGE, matrix 256×256, 180 sagittal slices, voxel size 1 mm³, on a GE 3 Tesla scanner) were acquired. The participant's head was tracked by an infrared-based stereotactic system and brought into co-registration with the MRI using a triangular system of anatomical landmarks (bilateral tragus and nasion) as well as a subsequent 9-point surface registration.

We used the eXimia system (Nexstim Ltd, Helsinki, Finland) to calculate the strength, location, and direction of the stimulating electric field in the cortical tissue which was derived from a dynamic spherical model. This information was adjusted in real time, and individual head size, shape, and physical parameters of stimulation were taken into account [32]. TMS pulses were delivered through an eXimia TMS stimulator connected to a focal monophasic figure-of-eight coil (70 mm outer diameter; Nexstim Ltd, Helsinki, Finland). Figure-of-eight coils affect a cortical area of about 1.7 cm² [33] or smaller [34,35] with a rapid decay of effect size to the margin [36] and with a precision comparable to that of intraoperative direct cortical stimulation [37] at a predefined peeling depth of between 20 and 25 mm. EMG samples from the eXimia system (sampling rate 3000 Hz) were obtained with the participants seated in a comfortable reclining chair and instructed to relax and keep their eyes open. Surface EMG electrodes (Neuroline 700, Ambu, Ballerup, Denmark) were attached to the abductor pollicis brevis (APB) and biceps brachii (BB) muscles of the arm contralateral to the stimulated hemisphere. Trains of similar stimuli were applied with interstimulus intervals (ISI) randomized between 1 and 3 seconds.

Primary and premotor cortical mapping

During the first session, individual bilateral M1 and PMC regions were mapped for an abductor pollicis brevis (APB) stimulation hotspot defined by the maximal motor evoked potential (MEP) response site with minimal suprathreshold TMS

intensity. Accurate mapping was facilitated by using a more focal monophasic stimulator instead of the more commonly-used and stronger biphasic type [38] with stimulation perpendicular to the underlying gyral projections.

External landmarks were identified for PMC regions and subsequently the PMC location was mapped for direct corticospinal output. The eXimia system provides the estimated maximum electric field strength induced under the coil (EF_{max}) and at any remote site (EF_{remote}) [39]. It employs a spherical model of the cortical surface, which has been validated for cortical targets in stimulation studies as well as preoperative identification of M1 [37,40]. After PMC hotspot identification, 20 minimal suprathreshold stimuli were applied at an intensity eliciting MEPs at an average amplitude of 200 μ V. This confirmed the reliable elicitation of corticospinal volleys. The concomitant EF_{remote} in M1 was estimated. Subsequently, 20 stimuli were applied with this EF_{remote} intensity and orientation directly over the M1 hotspot. If no MEPs were elicited then the MEPs that had been elicited by PMC stimulation were assumed to originate in the PMC and not to be due to distant co-stimulation of M1. This approach is a modified version of that successfully used by Teitti et al. [21]. They argued that if the EF_{remote} over M1 during frontal or premotor stimulation was below a level sufficient to elicit an MEP from M1 (i.e. below RMT), then the MEP must have originated from corticospinal projections other than those located in M1. Spangenberg et al. have reproduced this finding in brain tumor patients [41]. We built upon these findings by including control stimulation over M1 to prove that the assumption of a non-M1 origin is correct.

Corticospinal, intracortical and interhemispheric excitability

The MEP amplitude was defined by peak-to-peak measurements of belly-tendon surface recordings from the muscles contralateral to the dominant hemisphere with a background activity below a maximum of 20 μ V. Motor thresholds were defined within a 95% confidence interval by an efficient maximum-likelihood algorithm [42] and are given as a percentage of the maximum stimulator output (%MSO) required to elicit an average MEP response of 50 μ V (i.e. resting motor threshold, RMT), or 500 μ V (termed '500 μ V-MT') or 1 mV (termed '1 mV-MT'). Input-output curves were assessed by randomly applying ten stimuli at an intensity of 110%, 120%, 130% and

140% of the individual's RMT [22]. The associated assessment of cortical excitability at multiple stimulation strengths can provide explicit information about the target area [43], and importantly about corticospinal excitability per se as a measure of the common final descending pathway of all neuronal subsets. Care was taken to measure a reliable RMT, which was estimated per subject, measure and time slot individually. Interhemispheric inhibition (IHI) was measured bi-directionally using two TMS coils placed over the APB hotspots of the primary motor cortices of each hemisphere (Coil 1: Nexstim, Helsinki, Finland; Coil 2: Magstim 200, Magstim, UK). The navigation system was also used to place the second coil over the respective hotspot with high spatial precision. The conditioning stimulus (CS) trigger preceded the test stimulus (TS) trigger by 10 ms [44]. Intertrial intervals were set at random lengths of between 3–5 seconds. The stimulus intensity was set to 1 mV-MT for both the conditioning as well as the test stimulus. 20 stimuli were applied either with a CS preceding the TS or with the TS only, in a randomized order to avoid sequence effects. Short-interval intracortical inhibition (SICI) and intracortical facilitation (ICF) were tested with paired-pulses at interstimulus intervals (ISI) of 3 and 10 ms respectively [45]. CS were applied at 80% RMT and TS at the individual 1 mV-MT intensity. A total number of 20 stimuli were applied for each ISI. Subsequently, 20 stimuli with the TS only were taken as baseline.

Transcranial direct current stimulation (tDCS)

A bipolar constant current stimulator (DS5, Digitimer, CED, Cambridge, UK) was used to apply tDCS. The waveform was controlled by a digital-analog converter (Power1401 DAC and Spike2 software, both CED, Cambridge, UK). The center of the stimulation electrode was placed over the APB hotspot of the primary motor cortex of the dominant hemisphere using co-registered hotspots in individual MRI by the eXimia stereotactic system (Nexstim, Helsinki, Finland). The electrode's surface area was adapted to avoid effective stimulation of the adjacent PMC, to prevent high scalp current densities and to elicit an aftereffect in the stimulated M1 of about one hour [4,46]. A 16 cm² (6.4×2.5 cm) cathodal strip electrode of less than half the size of the 35 cm² electrodes used in early tDCS studies [22] was used and placed with its long axis parallel to the central gyrus to further diminish spread to the rostrally located PMC. The reference electrode, with a size of 35 cm², was placed over the supraorbital region of the opposite hemisphere to disperse the current to a non-effective level [4]. The electrodes were soaked in 0.9% sodium chloride solution and attached to the participant's head with adhesive tape.

A current of -0.7 mA with a current density of -0.04 mA/cm² was used [4]. Estimating the current density on the surface has been shown to be complex. Results vary depending on spherical or cylindrical models. For optimal predictive power, a geometric head model derived from actual MRI data should be used [47]. The cathodal tDCS consisted of ramping the current to -0.7 mA over 5 seconds, keeping it at this level for 9 minutes 50 seconds, and ramping it to 0 mA in another 5 seconds to avoid the unpleasant sensations that occur when rapidly switching the current on or off. Sham tDCS was also started with a 5-second ramping phase to -0.7 mA. This level of current was kept constant for 30 seconds (compared to 10 minutes verum stimulation) to give the participant a tingling sensation. The current was subsequently reduced to 0 mA over another 5 seconds and then kept at this level until a total of 10 minutes sham-stimulation was completed.

Data evaluation and statistics

MATLAB (Matlab®, Mathworks, Gatwick, USA) was used for signal processing and statistical testing. The strength of inhibition or facilitation in paired-pulse trials was quantified as a percent change normalized to the baseline. In accordance with established estimations of CSE [48,49], 20 MEP response input-output curve examinations were z-transformed to account for inter-individual MEP variability. For presentation, the normalized data were scaled to a real dimension in mV.

Electromyographic recordings were controlled online and post-hoc for muscle pre-innervation exceeding 20 μ V since pre-innervation is known to be associated with increased MEP size unrelated to intervention and possibly masking aftereffects [50]. This was done both by visual inspection of EMG traces during stimulation as well as post-hoc thresholding and regression analysis prior to data preprocessing. MEP onset latencies were automatically determined by the Nexstim software with an algorithm that utilizes the first deflection from the baseline of smoothed MEP traces.

A one-way analysis of variance (ANOVA) was calculated to compare mean MEP amplitudes before and after tDCS. A repeated measures ANOVA was calculated to test the null hypothesis that additionally recorded parameters between stimulation conditions (i.e. cathodal and sham) or MEP latencies between regions (i.e. M1 and PMC) did not differ (Table 1). Time was introduced as a two-level main factor for all tests because early and late aftereffects were expected to be different. TMS intensity was added as a four-level main factor for input-output curve testing as high and low-threshold neurons have been found to be affected differently by tDCS [4]. To determine if inhibitory or facilitatory circuits were affected, the interstimulus interval was included as a two-level main factor in paired-pulse trials [45]. If the null hypothesis was rejected at a 5% significance level, we performed a Tukey's honestly significant difference (HSD) post-hoc test as an alpha-error cumulative-corrected multiple comparison procedure.

We used a stepwise regression model to identify the electrophysiological parameters that were significant predictors of change in functional data (i.e. finger-tapping speed). To identify regional effects, measures of corticospinal and intracortical excitability from both M1 as well as from the PMC for verum conditions were included in the model.

Mean data is always given \pm its standard error. Mean differences between groups are given with the upper and lower margin of their 95% confidence interval (95% CI) in brackets. Bootstrapping was used to estimate the accuracy of the mean optimal electric field location and stimulus orientation of M1 and PMC hotspots within a 95% CI.

Results

Premotor mapping

PMC hotspots were successfully identified in all participants. The population average location of PMC hotspots was 17.09 mm rostral (95% CI: 14.94–18.99 mm) and 14.64 mm medial (95% CI: 12.52–16.73 mm) to the M1 hotspot on the cortical surface. Optimal coil orientation for M1 and PMC stimulation differed significantly (4.44° , 95% CI: 3.44 – 5.38°). Latencies of MEPs elicited by PMC stimulation (21.76 ms \pm 0.82) were comparable (-0.88 ms, 95% CI: -1.43 – 3.19 ms) to those following M1 stimulation (22.64 ms \pm 0.82) ($F_{(1,15)} = 0.58$, $p = 0.45$). Results did not differ between different muscle groups with respect to the target regions ($F_{(1,15)} = 0.61$, $p = 0.44$) (Table 1). However, MEP response latencies recorded proximally from the biceps were

Table 1. Summary of experimental results.

Interregional	df	F	p
<i>MEP Latency</i>			
Region	1	4.51	0.0380 *
Muscle	1	0.58	0.4490
Region x muscle	1	0.61	0.4395
Functional			
<i>Maximum tapping frequency</i>			
Intervention	1	1.05	0.3109
Time	1	0.47	0.4981
Intervention x Time	1	6.39	0.0152 *
Primary motor cortex			
<i>Corticospinal Excitability</i>			
Intervention	1	18.63	0.0000 *
<i>Resting motor threshold</i>			
Intervention	1	1.96	0.1669
Time	1	0.19	0.6608
Intervention x Time	1	6.61	0.0129 *
<i>Input-output curve</i>			
Intervention	1	0.50	0.4799
Time	1	0.04	0.8368
TMS intensity	3	286.33	0.0000 *
Intervention x Time	1	0.30	0.5865
Intervention x TMS intensity	3	3.84	0.0094 *
Time x TMS intensity	3	0.38	0.7702
Intervention x TMS intensity x Time	3	3.04	0.0280 *
<i>Paired pulse stimulation</i>			
Intervention	1	2.07	0.2489
Time	1	8.43	0.0039 *
ISI	1	72.78	0.0000 *
Intervention x Time	1	0.74	0.0615
Intervention x ISI	1	1.50	0.1230
Time x ISI	1	10.02	0.0017 *
Intervention x ISI x Time	1	5.68	0.0030 *
<i>Interhemispheric inhibition (non-dominant to dominant hemisphere)</i>			
Intervention	1	7.01	0.0102 *
Time	1	1.15	0.2873
Intervention x Time	1	0.12	0.7258
<i>Interhemispheric inhibition (dominant to non-dominant hemisphere)</i>			
Intervention	1	0.43	0.5179
Time	1	0.14	0.7133
Intervention x Time	1	0.46	0.5026
Premotor cortex			
<i>Resting motor threshold</i>			
Intervention	1	0.89	0.3551
Time	1	1.32	0.2604
Intervention x Time	1	5.59	0.0255 *
<i>Input-output curve</i>			
Intervention	1	22.13	0.0000 *
Time	1	0.11	0.7397
TMS intensity	3	208.58	0.0000 *

Table 1. Cont.

Interregional	df	F	p
Intervention x Time	1	0.18	0.6699
Intervention x TMS intensity	3	3.19	0.0246 *
Time x TMS intensity	3	1.57	0.1975
Intervention x TMS intensity x Time	3	1.61	0.1872

ANOVA results have been categorized with respect to whether data was compared between brain *regions* (i.e. primary motor cortex (M1) and dorsal premotor cortex (PMC)) or *interventions* (i.e. cathodal and sham stimulation) and whether they examine functional performance or electrophysiological properties. The test of MEP latency contains the two-level factor *muscle* for forearm and hand muscles. The two-level factor *time* distinguishes between early (<40 min) and late (>40 min) period aftereffects. The four-level factor *TMS intensity* refers to 10% increments of the individual resting motor threshold (RMT) used as stimulation intensities to assess input-output curves. Paired-pulse stimulation sequences contain the two-level factor ISI reflecting SICI and ICF protocols. Please refer to the methods section for further details. * p<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0057425.t001

shorter ($F_{(1,15)} = 4.51$, $p = 0.04$; difference: -1.78 ms, 95% CI: $-1.49 - -5.05$ ms).

Motor function

Cathodal tDCS had a significant time-dependent effect on maximum finger-tapping frequency ($F_{(1,15)} = 6.39$, $p = 0.02$). Post-hoc testing revealed that participants were significantly slower in the early period following cathodal tDCS (11.91%, 95% CI: 2.63–1.21%) than when having received sham tDCS ($p < 0.05$) (Figure 2). There was no difference between the groups in the late period.

Electrophysiological parameters

Primary motor cortex. Cathodal stimulation resulted in a decreased mean MEP amplitude by about 50% ($688 \pm 50 \mu V$ vs. $370 \pm 54 \mu V$; $F_{(1,15)} = 18.63$, $p < 0.05$). In contrast, MEP amplitudes after sham stimulation were similar to those obtained before stimulation ($732 \pm 46 \mu V$ vs. $717 \pm 44 \mu V$; $F_{(1,15)} = 0.06$, $p = 0.8$) (Figure 3a).

Stimulation significantly influenced resting motor thresholds (RMT; $F_{(1,15)} = 6.61$, $p = 0.013$) between groups in the post-stimulation period when time was considered. Post-hoc testing revealed that RMT was 9.18% (95% CI: 0.04 – 18.33%) higher in the cathodal stimulation condition compared to sham stimulation in the early period ($p < 0.05$). There was no late period aftereffect.

Input-output curve evaluation provided further evidence for a time-dependent inhibitory aftereffect when TMS stimulation intensity was considered ($F_{(3,15)} = 3.04$, $p = 0.03$). Post-hoc testing revealed that MEP amplitudes were 7.73% (95% CI: 0.32–15.15%) and 9.79% (95% CI: 2.74–12.73%) lower at TMS intensities of 130% and 140% RMT in the early post-tDCS period when preceded by cathodal stimulation instead of sham ($p < 0.05$). In the late period, in line with effects on RMT, MEP amplitudes were unchanged (Figure 3b).

Paired-pulse examinations revealed a clear relationship between intervention type, time and ISI ($F_{(1,15)} = 5.68$, $p = 0.003$). Post-hoc testing showed that in the early period, SICI following cathodal tDCS was significantly stronger at 32.95% (95% CI: 8.91 – 56.99%) than SICI following sham tDCS. Second level interactions suggest that paired-pulse stimulation might also be dependent on time, independent of intervention type ($F_{(1,15)} = 10.02$, $p = 0.002$). Post-hoc tests show that SICI was stronger in the early period than in the late period, independent of the tDCS type ($-59.77\% \pm 6.11$ vs. $-21.74\% \pm 6.41$, $p < 0.05$).

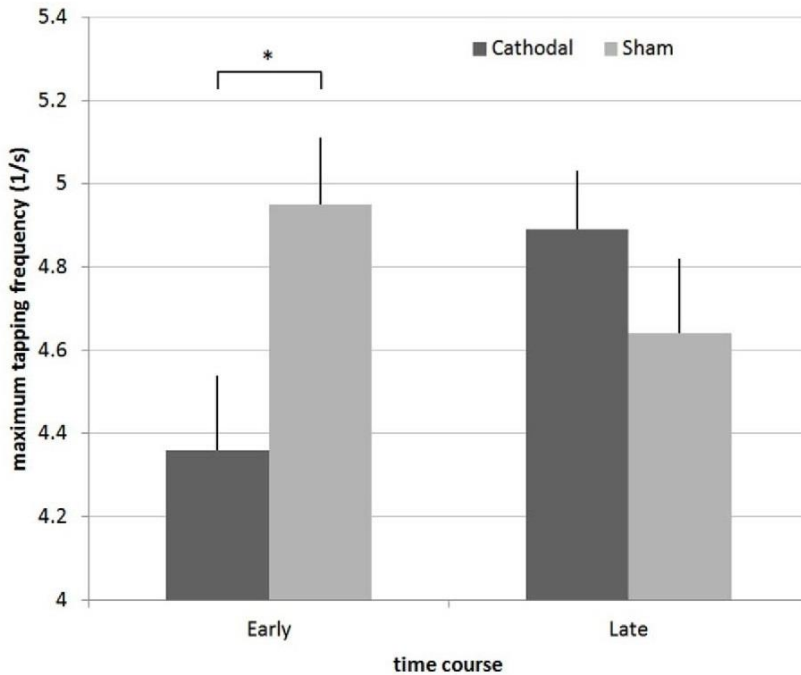


Figure 2. Maximum finger-tapping frequency reached in 30 seconds before and after 40 minutes (see Figure 1). Error bars represent the standard error of the mean. Finger-tapping speed is significantly slowed directly after cathodal stimulation as compared to sham stimulation or the late period. * $p < 0.05$
doi:10.1371/journal.pone.0057425.g002

Unlike all other measures of cortical excitability, SICI displayed a sign change in the late period, being 28.05% (95% CI: 2.82–53.28%) weaker in the cathodal condition. In contrast, ICF was unaffected by either time or stimulation (Figure 3c).

We found that the IHI in the dominant interventional hemisphere differed significantly between tDCS conditions ($F_{(1,15)} = 7.01$, $p = 0.01$). Post-hoc testing revealed a mean inhibition of corticospinal excitability of $45.64\% \pm 9.38$ in the cathodal vs. $15.97\% \pm 8.48$ in the sham condition in the early post-

stimulation period (95% CI of mean difference: $-4.4\% - -54.93\%$) in the ipsilateral interventional hemisphere. There was no significant difference in the late period or in the contralateral hemisphere.

Premotor cortex. Corticospinal excitability (CSE) evaluation revealed post interventional evidence for enhanced premotor CSE. MEP responses were significantly different for the individual TMS intensities ($F_{(3,15)} = 3.19$, $p = 0.03$). Post-hoc testing revealed that MEP amplitudes in the early period were 25.42% (95% CI: 9.92 –

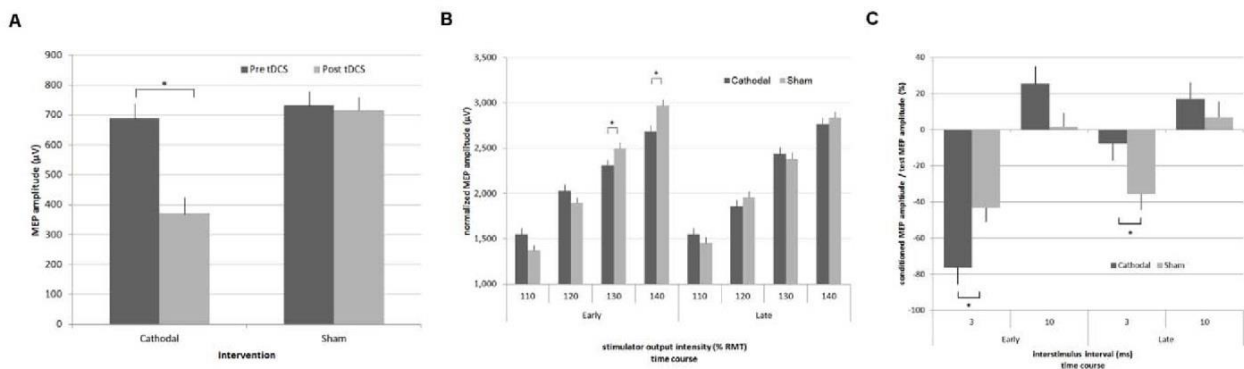


Figure 3. Results and comparison of electrophysiological responses to either cathodal or sham stimulation in the primary motor area. A) Cortical excitability estimates. MEP average amplitude in the early and later period. In contrast to sham tDCS, cathodal tDCS significantly diminished mean MEP amplitudes by about 50%. B) Input-output curves. MEP average amplitudes at 110% through 140% RMT. In contrast to sham tDCS, cathodal tDCS significantly diminished mean MEP amplitudes at stimulation strengths of 130% and 140% RMT. C) Short-interval intracortical inhibition (SICI) and intracortical facilitation (ICF). Average amplitudes of the test MEP at 2 and 5 ms ISI. SICI is enhanced in the early and significantly reduced in the late post-stimulation period after cathodal stimulation. ICF is not significantly affected by the cathodal stimulation. The time periods in all figures correspond to the definition of time intervals in Figure 1. Error bars represent the standard error of the mean. * $p < 0.05$
doi:10.1371/journal.pone.0057425.g003

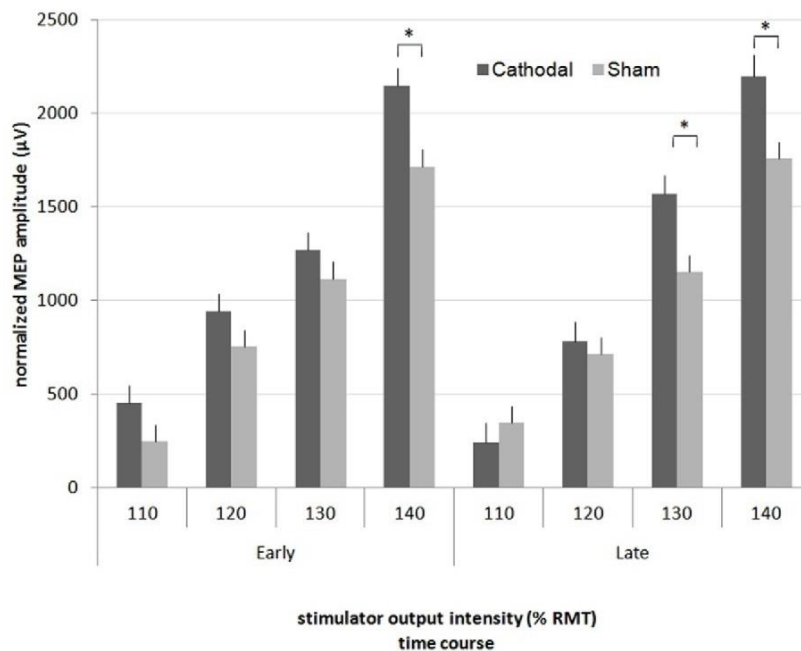


Figure 4. Input-output curves over PMC. MEP average amplitudes defined by stimulation at 110% through 140% RMT. In contrast to sham tDCS, cathodal tDCS significantly enhanced cortical excitability. Significant results were found at 130% (late period) and 140% (both periods) RMT. Error bars represent the standard error of the mean. * $p < 0.05$
doi:10.1371/journal.pone.0057425.g004

40.92%) higher in the cathodal condition than in the sham condition ($p < 0.05$) when assessed at 140% RMT. In the late period, MEP amplitudes were higher in the cathodal condition when assessed at 140% as well as 130% RMT (35.6%, 95% CI: 12.39 – 58.82% and 25.19%, 95% CI: 9.07 – 41.32%). RMT changes were intervention and time-dependent ($F_{(1,15)} = 5.59$, $p = 0.03$). Post-hoc testing revealed a late-onset increase in premotor RMT of 14.15% (95% CI: 1.98 – 26.91%) in comparison to sham tDCS ($p < 0.05$) (Figure 4).

Regression analysis

Stepwise regression analysis showed a significant positive correlation between MEP elicited at 130% RMT in the premotor area and finger-tapping performance (RMSE = 0.99, $R^2 = 0.51$, $p = 0.046$). Other results from primary or premotor areas did not show a significant relationship.

Discussion

The main findings of this study are that (1) ipsilateral PMC excitability increased after cathodal-tDCS-induced inhibition of M1, (2) PMC excitability increase outlasted established M1 excitability decrease and (3) PMC excitability at 130% RMT was the only predictor of faster finger-tapping speed. These results show that the PMC is affected by M1 cathodal inhibition with neurophysiological as well as behavioral consequences.

The site of cortical inhibition

To target M1 but not PMC with tDCS we adopted the methods suggested by Nitsche et al. [4] and Miranda et al. [47] and used a stimulation electrode with a smaller surface area (16 cm² vs. conventional 35 cm²), a rectangular instead of a quadratic shape, and reduced total current (−0.7 mA vs. conventional −1.0 mA).

Although previous brain stimulation studies with tDCS have successfully used larger electrodes to differentiate PMC from M1 effects (e.g. 35 cm² leads to opposite metabolic effects in ipsilateral M1 and dorsal PMC [14]), we believe that a more focal stimulation will prove to be preferable. Conversely, whereas 35 cm² electrodes have successfully differentiated effects in M1 and PMC, 9 cm² electrodes were recently shown to be inefficient [51]. Thus, the success of stimulation with a 16 cm² surface area must be measured by the strength of inhibition induced in M1. The findings of this study show that a 16 cm² tDCS electrode can induce increased SICI, lateralized IHI, increased RMT and reduced corticospinal excitability in accordance with well-established cathodal tDCS effects [4,19]. This confirms that the use of a smaller electrode was successful. Unlike Nitsche et al. we did not find a reduced ICF. However, this is not a novel finding and can be explained by more focal stimulation [15]. Similar to Lang et al. we found IHI to only be changed in the interventional hemisphere and not in the contralateral hemisphere [19]. However, Lang et al. found IHI to be decreased after cathodal tDCS, unlike the results in our study [19]. This might also be attributed to the use of smaller stimulation electrodes (16 cm² vs. 35 cm²). In summary, a smaller electrode than is typically used to differentiate M1 and PMC effects can effectively inhibit M1 electrophysiological and behavioral functions.

Sites of neurophysiologic assessment

To localize the PMC we followed previous studies that derived the location of the PMC from well-established external measures and anatomical landmarks (e.g. 2 cm rostral to M1) (see for example, [1,8,17,41,52]). For further validation we utilized neurophysiological parameters provided by navigated brain stimulation, as described recently [21,53]. We found the localization of the PMC by navigated stimulation to be successful. The

distances between PMC and M1 hotspots were comparable to established anatomical landmarks [54–56]. Thus, navigated brain stimulation can localize and help distinguish intracortical M1 from PMC target sites.

Premotor areas have been shown to be amenable to non-invasive brain stimulation methods by either single-pulse TMS [8,21,52] or plasticity-inducing stimulation protocols such as tDCS [15] and rTMS [16,20,57]. Building on multiple previous studies that investigate PMC stimulation and differentiate M1 effects [15–17,52,57], and as described previously [21,53], we retrieved volts per meter estimates to add additional confirmation that PMC stimulation did not induce co-stimulation of the (on average 2.25 cm) distant M1 site. Conversely, one might contend that the eXimia system's spherical model estimates validated for a cortical surface are not adequate for the depth of e.g. the central sulcus [36]. More explicitly, in this case, PMC stimulation might induce undetected distant co-activation of muscles in M1 and elicit MEPs either directly or indirectly via volume conduction in the APB hotspot itself or from muscles with lower thresholds than the APB [58]. This would be more critical at higher stimulation strengths, i.e. in this study for the input-output curves. We found similar, i.e. a non-significant trend to faster response latencies [21,53], reduced M1 and enhanced PMC corticospinal excitability. This study, like previous studies, cannot exclude the possibility that the future non-spherical estimation of deep currents along the anterior wall of the central sulcus might provide evidence for higher current densities in M1. Conversely, spurious co-activation cannot explain the success of previous studies in selective modification of PMC functions by tDCS or TMS [8,12,15,20,52] nor this study's findings of similar response latencies (for PMC and M1 stimulation) and decreased M1 yet enhanced PMC excitability after cathodal stimulation. Additionally, for direct corticospinal tract activation by stimulation of the subcortical white matter, the MEP response latencies would have been remarkably shorter [59] and amplitudes not affected by cathodal tDCS [60]. Conversely, the response latencies would have been remarkably longer in the case of activation via a PMC-M1 corticocortical pathway. None of these cases apply to the results found in this study. The results of this study, found by taking measurements over a well-established distant premotor site with focal nTMS and tDCS stimulation, match best with the notion of indirect 'posterior-anterior' stimulation of high-density projections originating in the PMC, which have been demonstrated convincingly in animal tracer studies [29].

Aftereffects found in PMC after cathodal tDCS over M1

This is the first study to investigate the electrophysiological properties of the PMC following cathodal M1 stimulation. However, several studies have assessed M1 response to PMC interventions [15,16,20,51,52,57]. These studies find both inhibitory and facilitatory pathways between the PMC and M1 [15,17,20,57] possibly related to gabaergic circuits [15,16,61] and dependent on both stimulation strength and frequency [20].

We find that artificially reduced M1 activity leads to reduced SICI in M1 and heightened PMC activity. Boros and colleagues found that artificially heightened PMC activity (anodal tDCS in their study) leads to suppression of SICI (i.e. gabaergic inhibition) in M1 [15]. Activity in the PMC was not assessed, so that a more direct comparison is not possible. The effect on SICI in the present study is not apparent in the early post-stimulation period, most likely because gabaergic interneuronal activity (intrinsic activity) is masked by the direct inhibitory tDCS aftereffects (extrinsic input) on gabaergic interneurons [4]. In summary, the gabaergic results are similar, suggesting, at least in part, the utilization of some

similar pathways. Concerning effects on corticospinal excitability, Gerschlagler et al. show that PMC inhibition leads to reduced and Rizzo et al. show that heightened PMC neural activity leads to heightened M1 excitability [16,57]. In line with these findings, we find enhanced (normalization of reduced) M1 excitability during enhancement of PMC excitability. Conversely, it is understood that M1 and PMC can share both facilitatory and inhibitory pathways relevant to the shaping and selection of movements [20]. Thus, the results of the present study could suggest that the facilitatory pathways are predominantly responsible for the compensation of attenuated movements. Yet the alternative explanation, enhanced inhibition of inhibitory pathways, is also plausible and the differentiation of these two pathway types remains unresolved by the present study.

Attenuated electrophysiological and behavioral findings in M1 are all well-established for cathodal tDCS [22]; e.g. with significant effects at 130% and 140% but not 110% RMT in input-output curves as well as similar effects on intracortical and interhemispheric circuits. Furthermore, we find clearly enhanced PMC excitability that is present both directly after cathodal tDCS and in a later period after M1 excitability has returned to normal. Interestingly, significant cortical excitability changes at 130% RMT are only present in this late period. Moreover, it is also the only predictor of motor performance. This selective effect is likely related to modification of the recruitment characteristics of corticospinal neurons [62], due to the 'time-dependent' and possibly NMDA-receptor-dependent modulation of different cortical systems [22]. A limitation to this study is that navigation software still cannot provide conclusive evidence against unspecific distant activation of low-threshold M1 neurons located e.g. at the depth of the precentral gyrus. This could have masked a possible association of motor performance with stronger stimulation strengths.

The finding of a secondary effect on the PMC after M1 inhibition is novel but not surprising as strong M1 PMC connectivity and compensatory mechanisms after M1 lesions are well established in both animals (for review see [7]) and patients [5,8,12,13,61,63]. Further late period effects were also found for RMT and SICI, which, although not predictive of motor performance, suggest the existence of concurrent changes in PMC and M1 intracortical circuitry [22]. The specific finding of a predictive association between cortical excitability at 130% RMT and motor performance deserves further investigation. In summary, cathodal tDCS over M1 in healthy test subjects induces changes in the ipsilateral PMC cortical excitability as assessed by TMS that are associated with motor performance.

A comparison with results from lesion studies

Presently, there is no non-invasive brain stimulation study in humans that has investigated how PMC responds to cathodal inhibition of M1. Conversely, as discussed above, studies in animals and humans clearly suggest that the PMC will respond strongly to a lesion-based impairment of primary motor function. Additionally, since tDCS has been successfully used in the recovery maximization of motor function in stroke patients through motor network modification, it seems tDCS partly interacts with and shares mechanisms of plasticity that occur in these patients. Thus, our results deserve a brief comparison. The results of this study suggest that future non-invasive brain stimulation studies might expect PMC excitability to be directly related to compensatory electrophysiological changes in M1 as well as motor performance. This is in line with previous evidence suggesting electrophysiological changes can precede and drive structural changes [64]; that reduced M1 excitability and

prolonged reaction times in M1 impaired patients are associated with compensatory, possibly partially vicarious PMC modifications [7,8,12]; and that increased PMC metabolic activity has been associated with a better outcome in stroke patients [10,65]. In contrast, increased PMC activity following M1 lesions has also been found to have a negative influence on motor performance [8,61]. Additionally, the role of ipsi- versus contralateral PMC remains unresolved [8,66]. These findings can possibly be explained by a direct association with the amount, extent, location and temporal dynamics of functional impairment and recovery processes in the central motor system [5,7,12,13,61]. The discussion of this study's results in the context of lesion studies is confined by the fact that the present study investigates healthy subjects after cathodal induction of an LTD-like effect that cannot elicit any structural changes and at best a transient functional perturbation [4,31]. Conversely, this study shows that transient inhibition of the primary motor cortex has direct consequences for

ipsi-interventional premotor neural assemblies and motor performance.

Conclusions

The findings of this study confirm that the attenuation of ipsilateral primary motor cortex function in healthy test subjects leads to longer-lasting changes in the ipsilateral premotor region. These premotor changes can be predictive of faster finger-tapping speed and are possibly related to gabaergic mechanisms.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SS RF RBP KI SAB. Performed the experiments: RF RBP. Analyzed the data: SS RF RBP. Contributed reagents/materials/analysis tools: SS RF RBP. Wrote the paper: SS RF RBP.

References

- Chouinard PA, Paus T (2006) The primary motor and premotor areas of the human cerebral cortex. *Neuroscientist* 12: 143–152.
- Freund HJ, Hummelshelm H (1985) Lesions of premotor cortex in man. *Brain* 108 (Pt 3): 697–733.
- Calautti C, Jones PS, Guinestre JY, Naccarato M, Sharma N, et al. (2010) The neural substrates of impaired finger tapping regularity after stroke. *Neuroimage* 50: 1–6.
- Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, et al. (2008) Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimul* 1: 206–223.
- Swayne OB, Rothwell JC, Ward NS, Greenwood RJ (2008) Stages of motor output reorganization after hemispheric stroke suggested by longitudinal studies of cortical physiology. *Cereb Cortex* 18: 1909–1922.
- Vines BW, Nair DG, Schlaug G (2006) Contralateral and ipsilateral motor effects after transcranial direct current stimulation. *Neuroreport* 17: 671–674.
- Dancause N (2006) Vicarious function of remote cortex following stroke: recent evidence from human and animal studies. *Neuroscientist* 12: 489–499.
- Johansen-Berg H, Rushworth MF, Bogdanovic MD, Kischka U, Wimalaratna S, et al. (2002) The role of ipsilateral premotor cortex in hand movement after stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14518–14523.
- Seitz RJ, Kleiser R, Butefisch CM (2005) Reorganization of cerebral circuits in human brain lesion. *Acta Neurochir Suppl* 93: 65–70.
- Rehme AK, Eickhoff SB, Wang LE, Fink GR, Grefkes C (2011) Dynamic causal modeling of cortical activity from the acute to the chronic stage after stroke. *Neuroimage* 55: 1147–1158.
- Liu Y, Rouiller EM (1999) Mechanisms of recovery of dexterity following unilateral lesion of the sensorimotor cortex in adult monkeys. *Exp Brain Res* 128: 149–159.
- Fridman EA, Hanakawa T, Chung M, Hummel F, Leiguarda RC, et al. (2004) Reorganization of the human ipsilesional premotor cortex after stroke. *Brain* 127: 747–758.
- Ward NS, Brown MM, Thompson AJ, Frackowiak RS (2004) The influence of time after stroke on brain activations during a motor task. *Ann Neurol* 55: 829–834.
- Lang N, Siebner HR, Ward NS, Lee L, Nitsche MA, et al. (2005) How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? *Eur J Neurosci* 22: 495–504.
- Boros K, Poreisz C, Munchau A, Paulus W, Nitsche MA (2008) Premotor transcranial direct current stimulation (tDCS) affects primary motor excitability in humans. *Eur J Neurosci* 27: 1292–1300.
- Gerschlagner W, Siebner HR, Rothwell JC (2001) Decreased corticospinal excitability after subthreshold 1 Hz rTMS over lateral premotor cortex. *Neurology* 57: 449–455.
- Groppa S, Schlaack BH, Munchau A, Werner-Petroll N, Dummweber J, et al. (2012) The human dorsal premotor cortex facilitates the excitability of ipsilateral primary motor cortex via a short latency cortico-cortical route. *Hum Brain Mapp* 33: 419–430.
- Kantak SS, Mummidisetty CK, Stinear JW (2012) Primary motor and premotor cortex in implicit sequence learning - evidence for competition between implicit and explicit human motor memory systems. *Eur J Neurosci* 36: 2710–5.
- Lang N, Nitsche MA, Paulus W, Rothwell JC, Lemon RN (2004) Effects of transcranial direct current stimulation over the human motor cortex on corticospinal and transcallosal excitability. *Exp Brain Res* 156: 439–443.
- Munchau A, Bloem BR, Irlbacher K, Trimble MR, Rothwell JC (2002) Functional connectivity of human premotor and motor cortex explored with repetitive transcranial magnetic stimulation. *J Neurosci* 22: 554–561.
- Teitti S, Maatta S, Saisanen L, Kononen M, Vanninen R, et al. (2008) Non-primary motor areas in the human frontal lobe are connected directly to hand muscles. *Neuroimage* 40: 1243–1250.
- Nitsche MA, Seeber A, Frommann K, Klein CC, Rochford C, et al. (2005) Modulating parameters of excitability during and after transcranial direct current stimulation of the human motor cortex. *J Physiol* 568: 291–303.
- Swayne OB, Rothwell JC, Ward NS, Greenwood RJ (2008) Stages of motor output reorganization after hemispheric stroke suggested by longitudinal studies of cortical physiology. *Cereb Cortex* 18: 1909–1922.
- Rehme AK, Eickhoff SB, Wang LE, Fink GR, Grefkes C (2011) Dynamic causal modeling of cortical activity from the acute to the chronic stage after stroke. *Neuroimage* 55: 1147–1158.
- Johansen-Berg H, Rushworth MF, Bogdanovic MD, Kischka U, Wimalaratna S, et al. (2002) The role of ipsilateral premotor cortex in hand movement after stroke. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14518–14523.
- Fridman EA, Hanakawa T, Chung M, Hummel F, Leiguarda RC, et al. (2004) Reorganization of the human ipsilesional premotor cortex after stroke. *Brain* 127: 747–758.
- Nelles G, Spiekramann G, Jueptner M, Leonhardt G, Muller S, et al. (1999) Evolution of functional reorganization in hemiplegic stroke: a serial positron emission tomographic activation study. *Ann Neurol* 46: 901–909.
- Lang N, Nitsche MA, Paulus W, Rothwell JC, Lemon RN (2004) Effects of transcranial direct current stimulation over the human motor cortex on corticospinal and transcallosal excitability. *Exp Brain Res* 156: 439–443.
- Dum RP, Strick PL (1991) The origin of corticospinal projections from the premotor areas in the frontal lobe. *J Neurosci* 11: 667–689.
- Huber R, Maki H, Rosanova M, Casarotto S, Canali P, et al. (2013) Human Cortical Excitability Increases with Time Awake. *Cereb Cortex* 23: 1–7.
- Liebetanz D, Nitsche MA, Tergau F, Paulus W (2002) Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain* 125: 2238–2247.
- Ilmoniemi RJ, Ruohonen J, Karhu J (1999) Transcranial magnetic stimulation--a new tool for functional imaging of the brain. *Crit Rev Biomed Eng* 27: 241–284.
- Valero-Cabre A, Payne BR, Rushmore J, Lomber SG, Pascual-Leone A (2005) Impact of repetitive transcranial magnetic stimulation of the parietal cortex on metabolic brain activity: a 14C-2DG tracing study in the cat. *Exp Brain Res* 163: 1–12.
- Toschi N, Welt T, Guerrisi M, Keck ME (2009) Transcranial magnetic stimulation in heterogeneous brain tissue: clinical impact on focality, reproducibility and true sham stimulation. *J Psychiatr Res* 43: 255–264.
- Brasil-Neto JP, McShane LM, Fuhr P, Hallett M, Cohen LG (1992) Topographic mapping of the human motor cortex with magnetic stimulation: factors affecting accuracy and reproducibility. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 85: 9–16.
- Thielscher A, Kammer T (2004) Electric field properties of two commercial figure-8 coils in TMS: calculation of focality and efficiency. *Clinical Neurophysiology* 115: 1697–1708.
- Picht T, Mularski S, Kuehn B, Vajkoczy P, Kombos T, et al. (2009) Navigated transcranial magnetic stimulation for preoperative functional diagnostics in brain tumor surgery. *Neurosurgery* 65: 93–99.
- Jalinous R (2002) Principles of Magnetic Stimulator Design. In: Pascual-Leone A, Davey NJ, Rothwell J, Wassermann EM, Puri BK, editors. *Handbook of Transcranial Magnetic Stimulation*. 1st ed. London: Arnold. pp. 30–38.
- Ruohonen J, Ilmoniemi RJ (1999) Modeling of the stimulating field generation in TMS. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 51: 30–40.

PMC Compensation following Cathodal M1 Inhibition

40. Thielscher A, Kammer T (2002) Linking physics with physiology in TMS: a sphere field model to determine the cortical stimulation site in TMS. *Neuroimage* 17: 1117–1130.
41. Spangenberg P, Lücke S, Meschede M, Harders A (2012) Navigated transcranial magnetic brain stimulation: should the premotor cortex be stimulated for the mapping of the hand motor cortex? *Klinische Neurophysiologie* 43: 139.
42. Awiszus F (2003) TMS and threshold hunting. *Suppl Clin Neurophysiol* 56: 13–23.
43. Ridding MC, Rothwell JC (1997) Stimulus/response curves as a method of measuring motor cortical excitability in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 105: 340–344.
44. Kukawadia S, Wagle-Shukla A, Morgante F, Gunraj C, Chen R (2005) Interactions between long latency afferent inhibition and interhemispheric inhibitions in the human motor cortex. *Journal of Physiology-London* 563: 915–924.
45. Kujirai T, Caramia MD, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, et al. (1993) Corticocortical inhibition in human motor cortex. *J Physiol* 471: 501–519.
46. Porcisz C, Boros K, Antal A, Paulus W (2007) Safety aspects of transcranial direct current stimulation concerning healthy subjects and patients. *Brain Res Bull* 72: 208–214.
47. Miranda PC, Faria P, Hallett M (2009) What does the ratio of injected current to electrode area tell us about current density in the brain during tDCS? *ClinNeuro*
48. Wassermann EM (2002) Variation in the response to transcranial magnetic brain stimulation in the general population. *Clinical Neurophysiology* 113: 1165–1171.
49. Schmidt S, Cichy RM, Kraft A, Brocke J, Irlbacher K, et al. (2009) An initial transient-state and reliable measures of corticospinal excitability in TMS studies. *Clinical Neurophysiology* 120: 987–993.
50. Di Lazzaro V, Profice P, Pilato F, Dileone M, Oliviero A, et al. (2010) The effects of motor cortex rTMS on corticospinal descending activity. *Clinical Neurophysiology* 121: 464–473.
51. Kirimoto H, Ogata K, Onishi H, Oyama M, Goto Y, et al. (2011) Transcranial direct current stimulation over the motor association cortex induces plastic changes in ipsilateral primary motor and somatosensory cortices. *Clin Neurophysiol* 122: 777–783.
52. Civardi C, Cantello R, Asselman P, Rothwell JC (2001) Transcranial magnetic stimulation can be used to test connections to primary motor areas from frontal and medial cortex in humans. *Neuroimage* 14: 1444–1453.
53. Vaalto S, Saisanen L, Kononen M, Julkunen P, Hukkanen T, et al. (2011) Corticospinal output and cortical excitation-inhibition balance in distal hand muscle representations in nonprimary motor area. *Hum Brain Mapp* 32: 1692–1703.
54. Fink GR, Frackowiak RS, Pietrzyk U, Passingham RE (1997) Multiple nonprimary motor areas in the human cortex. *J Neurophysiol* 77: 2164–2174.
55. Taubert M, Dafotakis M, Sparing R, Eickhoff S, Leuchte S, et al. (2010) Inhibition of the anterior intraparietal area and the dorsal premotor cortex interfere with arbitrary visuo-motor mapping. *Clin Neurophysiol* 121: 408–413.
56. Schluter ND, Rushworth MF, Passingham RE, Mills KR (1998) Temporary interference in human lateral premotor cortex suggests dominance for the selection of movements. A study using transcranial magnetic stimulation. *Brain* 121 (Pt5): 785–799.
57. Rizzo V, Siebner HR, Modugno N, Pesenti A, Munchau A, et al. (2004) Shaping the excitability of human motor cortex with premotor rTMS. *J Physiol* 554: 483–495.
58. Kimura J (2001) *Electrodiagnosis in Diseases of Nerve and Muscle: Principles and Practice*. New York: Oxford University Press.
59. Brocke J, Irlbacher K, Hauptmann B, Voss M, Brandt SA (2005) Transcranial magnetic and electrical stimulation compared: does TES activate intracortical neuronal circuits? *Clin Neurophysiol* 116: 2748–2756.
60. Nitsche MA, Nitsche MS, Klein CC, Tergau F, Rothwell JC, et al. (2003) Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol* 114: 600–604.
61. Takeuchi N, Tada T, Chuma T, Matsuo Y, Ikoma K (2007) Disinhibition of the premotor cortex contributes to a maladaptive change in the affected hand after stroke. *Stroke* 38: 1551–1556.
62. Devanne H, Lavoie BA, Capaday C (1997) Input-output properties and gain changes in the human corticospinal pathway. *Exp Brain Res* 114: 329–338.
63. Bestmann S, Swayne O, Blankenburg F, Ruff CC, Haggard P, et al. (2008) Dorsal premotor cortex exerts state-dependent causal influences on activity in contralateral primary motor and dorsal premotor cortex. *Cereb Cortex* 18: 1281–1291.
64. Witte OW, Bidmon HJ, Schiene K, Redecker C, Hagemann G (2000) Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1149–1165.
65. Nelles G, Spiekramann G, Jueptner M, Leonhardt G, Muller S, et al. (1999) Evolution of functional reorganization in hemiplegic stroke: a serial positron emission tomographic activation study. *Ann Neurol* 46: 901–909.
66. Werhahn KJ, Conforto AB, Kadom N, Hallett M, Cohen LG (2003) Contribution of the ipsilateral motor cortex to recovery after chronic stroke. *Ann Neurol* 54: 464–472.

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11 Komplette Publikationsliste

11.1. Originalarbeiten

Fleischmann R*, Duhm J*, Hupperts H, Brandt SA. Tablet computers with mobile electronic medical records enhance clinical routine and promote bedside time: a controlled prospective crossover study. Journal of Neurology 2014; [accepted for publication 07.11.2014].

(*equal contribution, arbitrary order)

Schmidt S, Bathe-Peters R, Fleischmann R, Ronnefarth M, Scholz M, Brandt SA. Nonphysiological factors in navigated TMS studies; Confounding covariates and valid intracortical estimates. Human brain mapping 2014; [Epub ahead of print].

Zdunczyk A*, Fleischmann R*, Schulz J, Vajkoczy P, Picht T. The reliability of topographic measurements from navigated transcranial magnetic stimulation in healthy volunteers and tumor patients. Acta Neurochir (Wien) 2013;155(7):1309-17.

(*equal contribution, arbitrary order)

Schmidt S*, Fleischmann R*, Bathe-Peters R, Irlbacher K, Brandt SA. Evolution of premotor cortical excitability after cathodal inhibition of the primary motor cortex: a sham-controlled serial navigated TMS study. PLoS One 2013;8(2):e57425.

(*equal contribution, arbitrary order)

Schmidt S, Mante A, Ronnefarth M, Fleischmann R, Gall C, Brandt SA. Progressive enhancement of alpha activity and visual function in patients with optic neuropathy: a two-week repeated session alternating current stimulation study. Brain Stimul 2013;6(1):87-93.

11.2. Fallberichte

Fleischmann R, Pruss H, Rosche B, Bahnemann M, Gelderblom H, Deuschle K, et al. Severe Cognitive Impairment Associated With Intrathecal Antibodies to the NR1 Subunit of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor in a Patient With Multiple Sclerosis. JAMA Neurology 2014; [Epub ahead of print].

Fleischmann R, Assmann A, Bohner G, Ruprecht K. Isolated myositis of the superior oblique muscle. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013;84(4):402-403.

Schmidt S, Fleischmann R, Picht T. Recovery of motor function after intensive navigated transcranial magnetic stimulation: a case report of unexpected therapeutic effects. Clin Neurol Neurosurg 2013;115(2): 215-217.

11.3. Abstracts

Fleischmann R, Schmidt S, Bathe-Peters R, Roennefarth M, Brandt S. P1066: Movement preparation requires early activation of the dorsal premotor area. Clinical Neurophysiology 2014;125:S332.

Fleischmann R, Hupperts H, Leiske S, Duhm J, Brandt S. Die mobile Patientenakte in der Neurologie: Evaluation der Praxistauglichkeit am Beispiel der neuroradiologischen Diagnostik. Klin Neurophysiol. 2014;45(01):P78.

Rönnefahrt M, Schmidt S, Bather-Peters R, Fleischmann R, Mante A, Althoff A, et al. Intersession reliability of cortical motor maps with navigated transcranial magnetic stimulation. 5th International Conference on Non-Invasive Brain Stimulation Leipzig 2013; P13.

Mante A, Rönnefahrt M, Fleischmann R, Ambrus G, Gall C, et al. Repetitive transorbital alternating current stimulation (rtACS) alpha activity enhancement in patients with visual field deficits: a prospective, randomized, blinded, controlled, multicenter study. 5th International Conference on Non-Invasive Brain Stimulation. Leipzig 2013; P228.

Bathe-Peters R, Schmidt S, Fleischmann R, Rönnefahrt M, Brandt SA. Predicting and correcting the influence of pre-innervation on motor cortex excitability. 5th International Conference on Non-Invasive Brain Stimulation. Leipzig 2013; P179.

Zdunczyk A, Fleischmann R, Schulz J, Picht T, Vajkoczy P. Test/retest variability of navigated transcranial magnetic stimulation in healthy subjects and brain tumor patients. 63rd Annual Meeting of the German Society of Neurosurgery (DGNC). Leipzig: German Medical Science GMS Publishing House 2012; DocDO.11.02.

Rönnefarth M, Schmidt S, Fleischmann R, Picht T, Brandt SA. Interneuronal assemblies reflect early neural reorganization after operative revascularization. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie. Klin Neurophysiol. 2011; P317.

Bathe-Peters R, Fleischmann R, Schmidt S, Brandt SA. Dynamic context-dependent somatotopy of the primary motor representation. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie: Klin Neurophysiol. 2011; P310.

Schmidt S, Picht T, Fleischmann R, Prokscha T, Irlbacher K, et al. Navigated multimodal presurgical evaluation of motor representations in patients with perirolandic tumors. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie: Klin Neurophysiol. 2010; ID99.

Fleischmann R, Schmidt S, Irlbacher K, Brandt SA. Mapping direct corticofugal motor and premotor projections with nTMS. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie: Klin Neurophysiol. 2010; ID113.

Fleischmann R, Schmidt S, Roehmel J, Kraft A, Brandt SA. Transcranial direct current stimulation: functional lateralization in healthy subjects with a virtual lesion? Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie: Klin Neurophysiol. 2009; P348.

Fleischmann R, Schmidt S, Holst E, Mundt M, Brandt SA. The subjective movement threshold (SMT). Bernstein Symposium 2008. Munich: Front. Comput. Neurosci. Conference Abstract: Bernstein Symposium 2008.

12 Danksagung

In erster Linie gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Stephan Brandt und Dr. Sein Schmidt. Stephan, Du hast ermöglicht, dass ich Teil Deiner Forschungsgruppe mit all ihren wissenschaftlichen Möglichkeiten und einem ausgezeichneten Teamgeist werden durfte. Du hast meine Arbeit stets aufmerksam verfolgt, mich in den Anfangstagen meiner wissenschaftlichen Tätigkeit unterstützt und mit Deiner Erfahrung gefördert. Ich danke Dir dafür von ganzem Herzen. Sein, Du hast mich während der letzten Jahre kontinuierlich unterstützt, hast mir stets Deine Ratschläge und Dein Wissen zur Verfügung gestellt und immer an mich geglaubt. Ohne Dich wäre diese Arbeit niemals entstanden. Auch Dir danke ich von ganzem Herzen.

Danke liebe Maria, lieber Rouven und lieber Alf. Die vielen Stunden im Labor wären ohne Euch wesentlich schwerer gewesen. Euer Ehrgeiz war mir gerade in den letzten Zügen dieser Arbeit ein enormer Ansporn.

Danke lieber Sven, liebe Kerstin, liebe Steffi und liebe Antje für die vielen aufschlussreichen Gespräche und Eure Geduld, wenn ich Euch mal wieder mit Fragen zu Methoden und Statistik konfrontiert habe. Ich freue mich, auch weiterhin mit Euch forschen und auch Gespräche abseits dessen führen zu können.

Aufrichtig danken möchte ich meinen Eltern Michaela und Holger sowie meiner Schwester Katrin. Ich kann mir keine besseren vorstellen.

Die folgenden Personen sind in den letzten Jahren zu wichtigen Wegbegleitern geworden. Sie sollen ebenfalls erwähnt werden: Angelika, Tobias, Rob Compton, Daniel, Elena, Arne und Lina. Ihr wisst, warum ich mich Euch sehr verbunden fühle.