

Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Integration neuer  
Nervenzellen im Gyrus dentatus nach experimentellen  
Schlaganfällen

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Florus Voitke  
geboren am 06.08.1989 in Altenburg.**

**Gutachter:**

**1. Prof. Dr. Otto W. Witte, Medizinischer Vorstand des Universitätsklinikums  
Jena**

**2. PD Dr. med. Elisabeth Türk, Oberärztin der Klinik für Notfallmedizin des  
Universitätsklinikums Jena**

**3. Prof. Dr. med. Christoph Redecker, Chefarzt der Klinik für Neurologie und  
Neurogeriatrie des Klinikums Lippe**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.06.2021**

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis .....	1
2	Abkürzungsverzeichnis.....	2
3	Zusammenfassung .....	3
4	Einleitung.....	5
4.1	Der Schlaganfall und die aktuelle Therapie .....	5
4.2	Adulte Neurogenese.....	6
4.3	Morphologie der neu gebildeten Neuronen .....	9
4.4	Beeinflussung der Neurogenese .....	10
4.5	Neurogenese nach Schlaganfällen.....	11
4.6	Neurogenese und Kognition .....	13
5	Zielstellung .....	15
6	Publizierte Originalarbeit.....	16
	Adult hippocampal neurogenesis poststroke: more new granule cells but aberrant morphology and impaired spatial memory. Woitke F, Ceanga M, Rudolph M, Niv F, Witte OW, Redecker C, Kunze A, Keiner S. PLoS One 2017; 12 (9): e0183463. Published online. doi: 10.1371/journal.pone.0183463; 2017 Sep 14	
7	Diskussion .....	17
7.1	Adulte Neurogenese nach Laufradhaltung .....	17
7.2	Adulte Neurogenese nach Schlaganfall.....	18
7.3	Postischämische adulte Neurogenese mit zusätzlichem Laufradtraining....	20
7.4	Morphologie adult gebildeter Neuronen nach Schlaganfall und Laufradtraining .....	22
7.5	Kognitive Fähigkeiten im MWM nach Schlaganfall und Laufradhaltung.....	26
8	Fazit .....	31
9	Literaturverzeichnis .....	32
10	Anhang .....	44
10.1	Abbildungsverzeichnis.....	44
10.2	Lebenslauf.....	45
10.3	Danksagung .....	47
10.4	Ehrenwörtliche Erklärung .....	49

## 2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABN	Adult born neurons (adult gebildete Neuronen)
CA3-Region	Cornu-Ammonis-3-Region
DCX	Doublecortin
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
FGF-2	Fibroblast growth factor 2 (Fibroblasten Wachstumsfaktor 2)
GFAP	glial fibrillary acidic protein (saures Gliafaserprotein)
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GZS	Granularzellschicht
IGF-1	Insulin-like growth factor (insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1)
MCAO	middle cerebral arteria occlusion (Okklusion der mittleren cerebralen Arterie)
MWM	Morris Water Maze (Wasserlabyrinth nach Morris)
MZS	Molekularzellschicht
NeuN	neuronal nuclear antigen (neuronales Kernantigen)
NGF	nerve growth factor (Nerven Wachstumsfaktor)
SGZ	Subgranulärzone
SVZ	Subventrikulärzone

### 3 Zusammenfassung

Es ist allgemein anerkannt, dass ischämisch-induzierte Schlaganfälle die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus der Hippocampusformation stimulieren. Vorherige Studien konnten diesbezüglich nachweisen, dass neben den regulär integrierten neugebildeten Neuronen der Schlaganfall auch aberrante fehlintegrierte Neuronen generiert und dies zu maladaptiven Prozessen führen kann. Inwieweit die post-ischämische Neurogenese die kognitive Funktion beeinflusst und welche Auswirkungen zusätzliche körperliche Aktivität hat, ist größtenteils ungeklärt und sollte in der vorliegenden Arbeit analysiert werden. Es wurde bei C57BL/6-Mäusen die Arteria cerebri media mit dem MCAO-Modell verschlossen und dadurch ischämische Schlaganfälle induziert. Die Tiere wurden nach Ischämie-Induktion unter Standardbedingungen oder unter Standardbedingungen mit freiem Zugang zu Laufrädern über einen Zeitraum von sieben Wochen gehalten. Zur Analyse der Neurogenese erhielten die Mäuse den Proliferationsmarker 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine intraperitoneal einmal täglich über einen Zeitraum von 13 Tagen und einen GFP-gekoppelten retroviralen Vektor am vierten Tag postoperativ intrahippocampal injiziert. Um die Gedächtnisleistung zu untersuchen, wurde eine modifizierte Version des Wasserlabyrinths nach Morris angewendet, welches eine Differenzierung zwischen Hippocampus-abhängigen und Hippocampus-unabhängigen Strategien ermöglichte. Nach der transkardialen Perfusion wurden die Hirne aufgearbeitet, immunhistochemische Verfahren und die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie genutzt. Mit dem Analyseprogramm Neurolucida wurden die morphologischen Veränderungen der Neuronen ausgewertet. Die Analysen ergaben, dass der Schlaganfall die adulte Neurogenese signifikant steigerte. Morphologische Rekonstruktionen retroviral markierter Neuronen zeigten insbesondere nach der cerebralen Läsion die Bildung aberranter Neuronen mit basalen Dendriten und einer ektopen Lokalisation (z.B. im Hilus). Des Weiteren bewirkte der Schlaganfall eine Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten, die mit einer Reduktion von Hippocampus-abhängigen Suchstrategien im Wasserlabyrinth nach Morris einherging. Das zusätzliche Laufradtraining steigerte signifikant die Anzahl neuer Neuronen gegenüber der Kontrollgruppe. Bei den Tieren mit induziertem Schlaganfall kam es durch die körperliche Aktivität zu einer weiteren Steigerung der Neurogenese, die mit einem größeren Anteil aberranter Neuronen einherging. Im Verhaltenstest wies das

post-ischämische Laufradtraining außerdem keine Verbesserung des räumlichen Denkvermögens gegenüber Tieren mit Schlaganfall unter Standardhaltung auf.

Die vorliegende Studie konnte erstmalig zeigen, dass ischämische Hirninfarkte hippocampusbezogene Gedächtnisstörungen hervorrufen, welche mit einer aberranten Neurogenese im Gyrus dentatus assoziiert sind. Ein zusätzliches post-ischämisches Laufradtraining bewirkte keine Verbesserung der Kognition und führte zu einer vermehrten Bildung aberranter Neuronen. Diese Ergebnisse deuten auf eine Ischämie-induzierte maladaptive Funktion neugebildeter Neuronen im Hippocampus hin.

## 4 Einleitung

### 4.1 Der Schlaganfall und die aktuelle Therapie

Der Schlaganfall ist eine der schwersten bekannten Krankheiten, da er 2015 weltweit die häufigste Ursache für schwere und mittelschwere Behinderungen und die zweithäufigste Todesursache darstellte (Group 2017, Katan und Luft 2018). Global betrachtet wurden 2015 6,5 Millionen Todesfälle durch diese Erkrankung festgestellt, wobei der größte Anteil der Betroffenen in den alternden Gesellschaften der Industrieländer zu beklagen ist (Katan und Luft 2018). Dabei sind die Inzidenz und die Beeinträchtigung der Lebensqualität durch den ischämischen Schlaganfall deutlich ausgeprägter als durch den hämorrhagischen (Group 2017, Katan und Luft 2018). Bei der Pathologie des ischämischen Schlaganfalls kommt es zu einem Verschluss oder einer hochgradigen Verengung der hirnversorgenden Gefäße mit einem Absterben der umliegenden Nervenzellen (Donnan et al. 2008). Falls die Patienten nicht an der Erkrankung versterben, kommt es häufig zu dauerhaften körperlichen Einschränkungen. Der Neuronenuntergang führt zu Störungen im Bereich von Sensorik, Motorik, Gleichgewicht und Sprache, aber auch kognitive und psychiatrische Schädigungen können im Verlauf der Erkrankung auftreten (Vermeer et al. 2003). Viele Veränderungen lassen sich dabei mit dem Untergang der für die Region verantwortlichen Nervenzellen erklären. Die kognitiven Veränderungen, im Sinne einer Reduktion der Denkgeschwindigkeit, der Merkfähigkeit und des Orientierungsvermögens, treten aber unabhängig von der Lokalisation der Läsion auf (Prins et al. 2005, Blum et al. 2012). Diese Formen der Beeinträchtigung werden häufig in der akuten Behandlungshase nicht erkannt, obwohl in aktuellen Studien, abhängig von Definition und Methodik, kognitive Defizite bei bis zu 70 % der Probanden festgestellt wurden (Jokinen et al. 2015). Zudem konnten diese Veränderungen auch bei ansonsten klinisch erfolgreich rehabilitierten Patienten nachgewiesen werden (Jokinen et al. 2015). Das kognitive Defizit ist dabei chronisch und konnte zwei Jahre nach dem Ereignis anhaltend bei 70 % der Patienten nachgewiesen werden (Rasquin et al. 2005). Nach zehn Jahren traten diese Veränderungen noch bei 50 % der Probanden auf und auch 15 Jahre später konnten noch Defizite gefunden werden (Teasdale und Engberg 2005, Schaapsmeeders et al. 2013). Die Pathophysiologie, die zu diesen von den direkten Läsionen unabhängigen Veränderungen führt, ist noch immer unklar. Die Therapie von Schlagfällen ist derzeit weitgehend auf eine akute Reduktion der ischämischen Hirnschädigung und ein Rehabilitationstraining für das

geschädigte Areal reduziert (Donnan et al. 2008, Pollock et al. 2014). Außerdem werden Präventionsprogramme zur Vermeidung der Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und zur Erkennung der Symptomatik durch die Patienten selbst eingesetzt (O'Donnell et al. 2010).

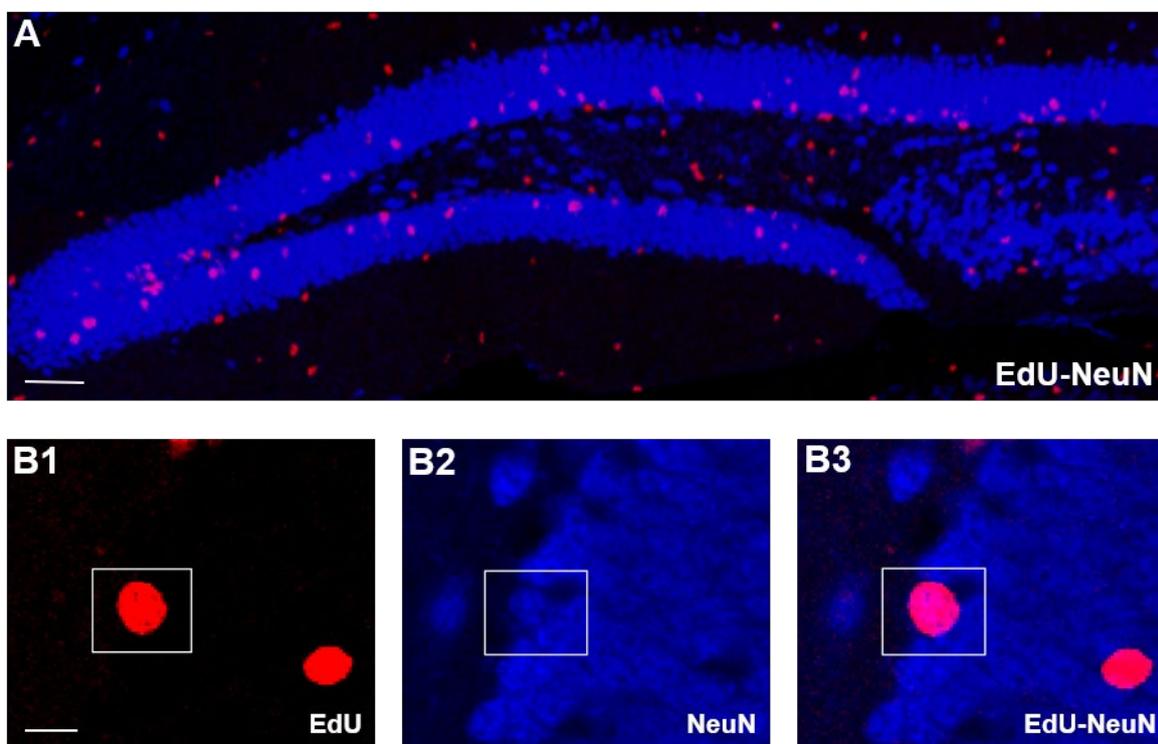
Bei zügiger Diagnosestellung und Behandlung kann in einem Zeitfenster von drei bis sechs Stunden nach Beginn der Symptomatik bei einem geringen Teil der Patienten eine Therapie durch eine systemische Thrombolyse durchgeführt werden (Hacke et al. 1995, Brott und Bogousslavsky 2000, Donnan et al. 2008). Neben dieser Therapie wurde in den letzten Jahren die endovaskuläre Thrombektomie als weitere Methode für große Gefäßverschlüsse etabliert, welche dabei der alleinigen Thrombolyse überlegen ist und in einem verlängerten Zeitraum von 6 bis 24 Stunden noch ein Benefit für die Patienten erbringt (Berkhemer et al. 2015, Campbell et al. 2015, Bracad et al. 2016, Nogueira et al. 2018). Außer diesen, nur bei einem Teil der Patienten durchführbaren, Interventionen gibt es keine Möglichkeiten einer Verhinderung des neuronalen Zelluntergangs. Die zunehmend angewendeten akuten Behandlungen des Schlaganfalls führen aber zu einem deutlich besseren Überleben der Patienten, jedoch kommt es dadurch zu einer immer größer werdenden Zahl an Betroffenen von schlaganfallassozierten Behinderungen (Lackland et al. 2014). Um diese Einschränkungen der geschädigten Patienten im alltäglichen Leben zu reduzieren, besteht in der Rehabilitation ein weiteres wichtiges Therapiekonzept (Pollock et al. 2014).

Rehabilitatives Training ist schon seit langem bekannt und sollte so früh wie möglich bereits in dem behandelnden Krankenhaus begonnen werden (Twitchell 1951, Evans et al. 1995, Kollen et al. 2006). Die physio- und ergotherapeutischen Behandlungskonzepte zielen dabei auf die synaptische Plastizität des Gehirns ab, wodurch eine Wiederherstellung der verlorenen Fähigkeiten möglich ist (Logan et al. 2004, Wolf et al. 2008, Rabadi et al. 2008). Eine Behandlung der kognitiven Veränderungen wird mittlerweile in der chronischen Behandlungsphase ebenfalls durchgeführt, aber ein klares pathophysiologisches Konzept oder ein apparativer bzw. laborchemischer Nachweis existieren noch nicht (Mijajlovic et al. 2017).

### 4.2 Adulte Neurogenese

Neben der synaptischen Plastizität im Gehirn existiert eine weitere zerebrale Dynamik im Rahmen einer Neubildung von Nervenzellen. Diese, als adulte Neurogenese

bezeichnete, zelluläre Plastizität wurde, entgegen des Dogmas einer im adulten Gehirn sistierten Neurogenese, erstmals in den 60er Jahren im Hippocampus und im Bulbus olfactorius bei Ratten beschrieben (Altman und Das 1965, Altman 1969). Der Nachweis erfolgte dabei initial mit dem radioaktiv markierten Thymidinanalogon  $[3H]$ -Thymidin, die im Weiteren durch Proliferationsmarker wie 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) und 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU) ersetzt wurde (del Rio und Soriano 1989, Chehrehasa et al. 2009). Dabei wird die Substanz intraperitoneal injiziert und anschließend während der Mitose statt Thymidin eingebaut, wodurch die neugebildeten Neuronen nachweisbar waren (siehe Abb. 1) (Kluska et al. 2005, Kunze et al. 2006, Keiner et al. 2008). Die Generierung neuer Neuronen war so in verschiedenen Tieren möglich und konnte schließlich über zur Tumordiagnostik appliziertes BrdU, auch beim Menschen nachgewiesen werden (Eriksson et al. 1998). Das Ausmaß der humanen Neurogenese konnte später durch radioaktive Rückstände von Nukleartests im menschlichen Körper mit 700 Zellen pro Tag genau quantifiziert werden (Spalding et al. 2013).



*Abb. 1: Darstellung des Gyrus dentatus des Hippocampus (A) mit reifen Neuronen (blau, Antikörper gegen NeuN) und dem Proliferationsmarker EdU (rot). (B1/B2/B3) Ausschnitt einer neuen Nervenzelle mit EdU (B1: rot), mit NeuN (B2: blau) und EdU-NeuN (B3: rot über blau). Eine mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie durchgeführte Kolokalisation zeigt die Bildung einer neuen Nervenzelle (B3). Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$  (A1) bzw. 10  $\mu\text{m}$  (B1-B3).*

Der Ursprung der, in der englischen Literatur als Adult Born Neurons (ABN) bezeichneten, im adulten Gehirn generierten Nervenzellen besteht in sogenannten neurogenen Nischen. In diesen werden über verschiedene Entwicklungsschritte auf der Grundlage von neuronalen Stammzellen neue Neuronen generiert. Im Hippocampus entwickeln sich die Vorläuferzellen in der Subgranulärzone (SGZ) des Gyrus dentatus, migrieren in die Körnerzellschicht, differenzieren und integrieren sich in das bestehende Netzwerk (Kaplan und Hinds 1977, van Praag et al. 2002). Zum Bulbus olfactorius migrieren die Zellen ausgehend von der Subventrikulärzone (SVZ) der Seitenventrikel über den rostralen Migrationsstrom und differenzieren schließlich im Riechhirn (Kaplan und Hinds 1977, Alvarez-Buylla und Nottebohm 1988, Lois und Alvarez-Buylla 1993).

Da der Hippocampus im adulten Gehirn für Lernprozesse und die räumliche Orientierung verantwortlich ist, spielt die Neurogenese am ehesten in der Pathogenese und Rehabilitation des Schlaganfalls eine Rolle (Scoville und Milner 1957, Morris et al. 1982, Moscovitch et al. 2005). Die Integration der neugebildeten Neuronen und ihr Anteil an der Funktion des Hippocampus konnten in zahlreichen Studien nachgewiesen werden (van Praag et al. 2002, Adlaf et al. 2017).

Die Neuronenbildung in der SGZ ist physiologisch dabei strengen Regulierungsvorgängen unterworfen und nur ein kleiner Teil der neuen Neuronen zeigt eine abweichende Morphologie (Shapiro und Ribak 2005). Diese Entwicklung verläuft über mehrere Wochen in sechs Stufen, wobei von den Vorläufern unterschiedliche spezifische Marker exprimiert werden (Kempermann et al. 2004). Die neuronalen Stammzellen, von denen die Neurogenese ausgeht, werden als Typ-1-Zellen bezeichnet. Aus diesen Zellen können durch asymmetrische mitotische Teilung durchschnittlich dreimal Progenitorzellen hervorgehen, bis sie sich zu Astrozyten umwandeln (Encinas et al. 2011). Die Progenitorzellen können in drei verschiedene Stadien (Typ 2a-, 2b- und 3-Zellen) mit unterschiedlicher mitotischer Teilungsaktivität und Differenzierung unterteilt werden (siehe Abb. 2) (Kempermann et al. 2004). Diese einzelnen Subpopulationen können durch ihre spezifische Markerexpression analysiert werden. Während der Differenzierung der Vorläuferzellen, geprägt von umfassenden Regulierungsmechanismen, entstehen schließlich aus einem geringen Teil der Progenitorzellen unreife Neuronen (Kempermann et al. 1998, Kempermann et al. 2004, Encinas et al. 2011, Sierra et al. 2015, Toda und Gage 2018). Diese reifen weiter aus und integrieren sich in das bestehende neuronale Netzwerk durch die

Ausbildung apikaler Dendritenbäume und eines basalen Axons (van Praag et al. 2002, Laplagne et al. 2006, Zhao et al. 2008, Adlaf et al. 2017, Toda und Gage 2018).

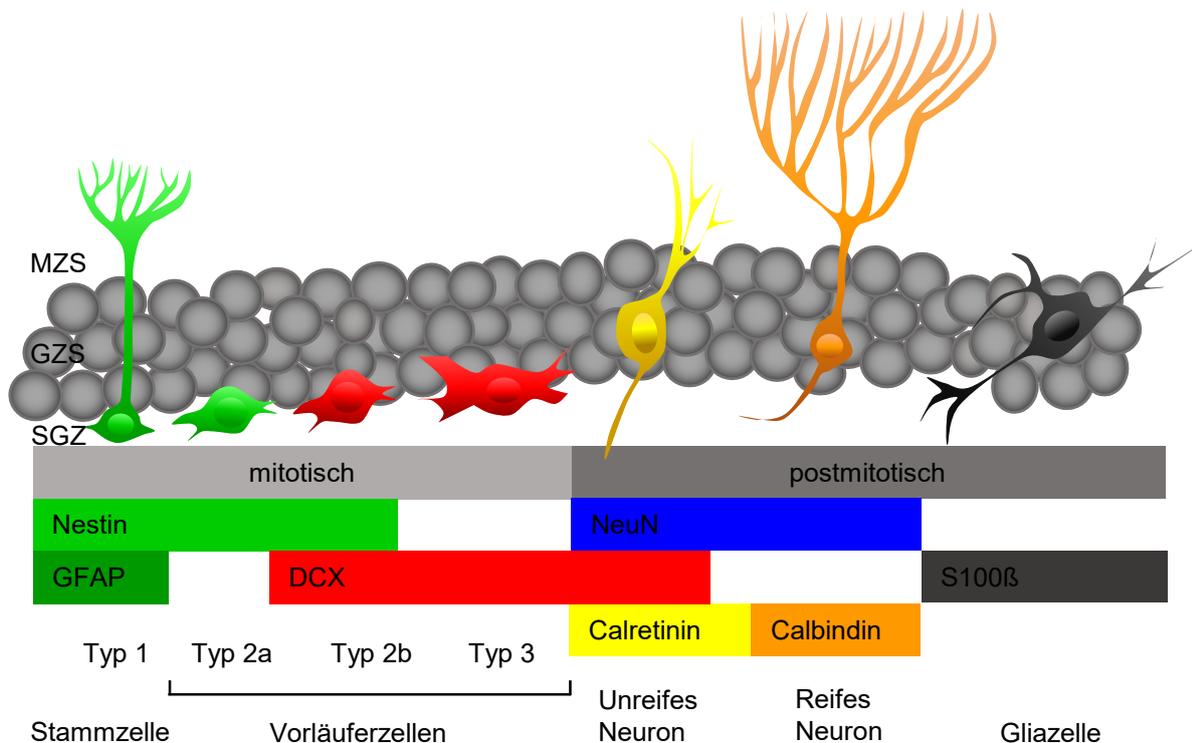


Abb. 2 Darstellung der Phasen der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus der Hippocampusformation. Die neurale zur asymmetrischen Teilung fähige Stammzelle oder auch Typ-1-Zelle exprimiert Nestin und GFAP (saures Gliafaserprotein). Nach der Teilung vollzieht sich die Entwicklung zur Typ-2a-Zelle, die kein GFAP exprimiert. Bei der nächsten Stufe der Typ-2b-Vorläuferzelle sind Nestin und den neuronalen Marker Doublecortin (DCX) nachweisbar und bei der Typ-3-Zelle ausschließlich DCX. In der postmitotischen Phase unterscheiden sich die NeuN bildenden Neuronen, in Abhängigkeit ihres Reifegrades, durch die Bildung von Calretinin und Calbindin. Außerdem können aus den Stammzellen S100β-positive Astrozyten entstehen.

### 4.3 Morphologie der neu gebildeten Neuronen

Die Untersuchung der Morphologie der ABN ermöglichte die intrahippocampale Injektion eines retroviralen Vektors, welcher über Transfektion teilender Zellen eine Expression von grünfluoreszierendem Protein (GFP) auslöst (van Praag et al. 2002). Die Zellen besitzen nach sieben bis zehn Tagen Eigenschaften, welche eine Definition als Neuronen zulassen und beginnen ihre Integration in das bereits bestehende Netzwerk mit der Bildung des Axons in Richtung des Hilus und der Cornu-Ammonis-3-Region (CA3-Region) (Markakis und Gage 1999, van Praag et al. 2002). Später folgt der Dendrit mit Verzweigungen in der Molekularzellschicht, an dessen Dendritenbaum nach 14 Tagen ein Besatz mit Dornfortsätzen nachweisbar ist, welcher in weiteren

zwei Wochen vollständig auswächst (Vadodaria und Gage 2014). Der bekannte Marker für reife Neuronen NeuN kann, abhängig von der untersuchten Spezies, ab der dritten Woche nachgewiesen werden (Snyder et al. 2009b). Zur Einbindung in das bestehende Netzwerk ist anschließend eine elektrophysiologische Reifung nötig, welche bei Nagern über einen Zeitraum von zwei bis sieben Wochen stattfindet (Overstreet-Wadiche und Westbrook 2006, Ge et al. 2006, Zhao et al. 2006). Die Existenz von Dornfortsätzen ist dabei ein wichtiger Indikator für die Integration, da anhand dieser Strukturen eine Verbindung über Synapsen mit den bereits bestehenden Neuronen festgestellt werden kann (Toni et al. 2007, Toni et al. 2008). Außerdem ist der Nachweis einer Integration durch synaptische Proteine wie Synapsin möglich und wurde auch schon bei ABN nach Schlaganfall gezeigt (Niv et al. 2012). Teilweise kann es im Reifungsprozess der eigentlich unipolaren Neuronen zeitweilig zur Ausbildung eines basalen Dendriten zum Hilus kommen, welcher aber im Verlauf wieder abgebaut wird (Rao und Shetty 2004). Schlussendlich können nach einem Zeitraum von 28 Tagen die ABN schließlich morphologisch nicht mehr von den bereits vorhandenen Körnerzellen unterschieden werden, wohingegen elektrophysiologische Unterschiede bei Affen bis zu sechs Monate nachweisbar sind (Kohler et al. 2011).

#### 4.4 Beeinflussung der Neurogenese

Die umfassende Regulation der Neurogenese im Hippocampus wird durch verschiedene Stimuli beeinflusst (Kempermann 2011, Vadodaria und Gage 2014). Typische Reize sind dabei physiologische Faktoren, wie bestimmte genetische Voraussetzungen, Alterung, Stress und geistige oder körperliche Aktivität (Kuhn et al. 1996, Kempermann et al. 1997b, Kempermann et al. 1997a, Kempermann et al. 1998, van Praag et al. 1999a, Kempermann et al. 2002, Walter et al. 2011). In der Erforschung des Prozesses werden immer neue beeinflussende biochemische Faktoren entdeckt, welche eine Veränderung der Neurogenese durch das Überleben oder die Proliferation der Zellen auslösen (Vadodaria und Gage 2014). Bekannte Beispiele sind Transkriptionsfaktoren wie Brain-derived growth factor (BDNF) und Neurotransmitter wie Gamma-Aminobuttersäure (GABA), welche von speziellen Interneuronen produziert werden (Tozuka et al. 2005, Ge et al. 2006, Rossi et al. 2006, Dubeau et al. 2011, Choi et al. 2018, Toda und Gage 2018). Die experimentell am häufigsten angewendeten Stimulationen stellen dabei die körperliche Aktivität mit Laufradtraining und die Haltung in einer reizreichen Umgebung dar. Obwohl beide

Interventionen zu einer Steigerung der Neurogenese führen, ist der zugrundeliegende Mechanismus unterschiedlich. Laufradtraining führt größtenteils über eine Steigerung der Proliferation der Progenitorzellen zu einer erhöhten Anzahl von ABN, wohingegen die reizreiche Umgebung zu einer besseren Überlebensrate ausreifender Neuronen führt (Kempermann 2011, Vadodaria und Gage 2014, Toda und Gage 2018).

Die Neurogenese wird aber auch durch Pathologien wie Schlaganfälle, Hirnläsionen, psychiatrische Erkrankungen oder epileptische Anfälle beeinflusst (Parent et al. 1997, Liu et al. 1998, Jin et al. 2001, Sharp et al. 2002, Tureyen et al. 2004, Wang et al. 2011, Chambers 2013, Jessberger und Parent 2015, Yu et al. 2016). Deren zellulären Mechanismen der Beeinflussung von Proliferation, Reifung und Integration sind erst teilweise aufgeklärt.

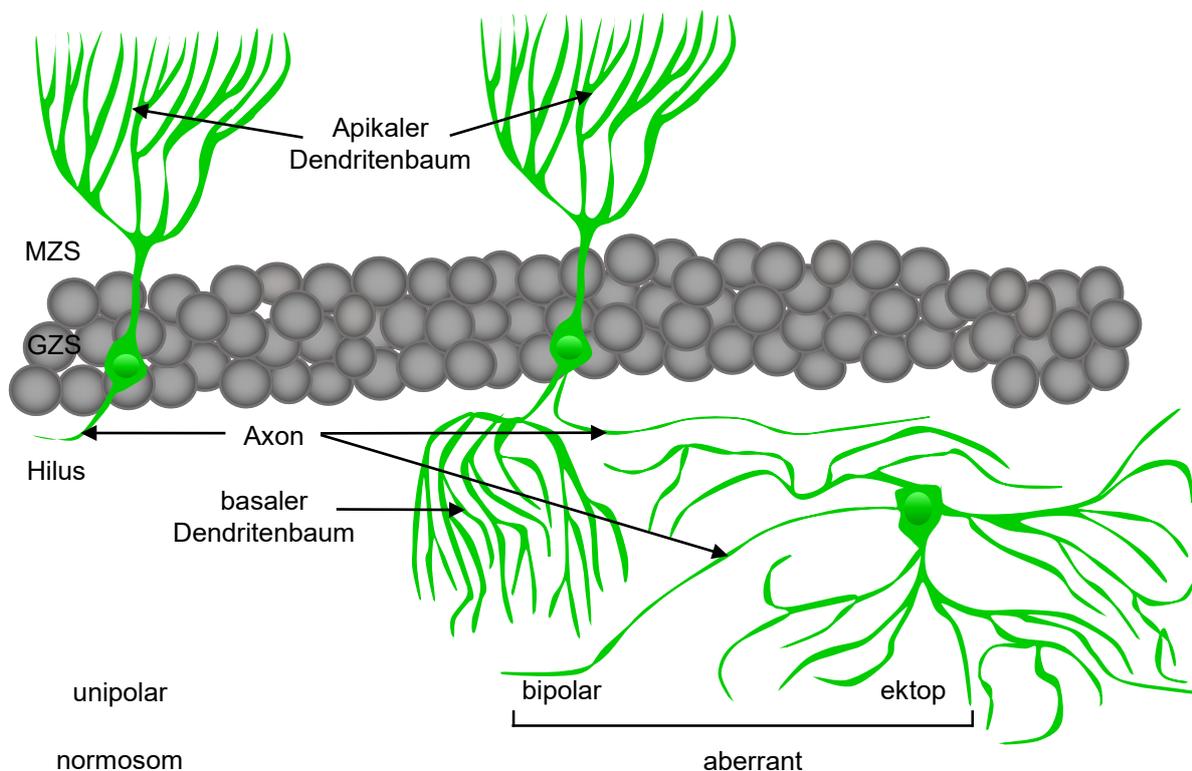
#### 4.5 Neurogenese nach Schlaganfällen

Im Rahmen der pathologischen Beeinflussung der Neurogenese kommt es bei experimentell induzierten Schlaganfällen durch eine Erhöhung von Proliferation der Stammzellen, abhängig von der Größe der Infarkte, zu einer Steigerung der Neurogenese (Liu et al. 1998, Jin et al. 2001, Sharp et al. 2002, Kluska et al. 2005, Geibig et al. 2012). Die positive Korrelation der Neurogenese mit dem Schlaganfallvolumen zeigt sich bei den Modellen der Photothrombose (PT) und des transienten Verschlusses der Arteria cerebri media, in der englischen Literatur als middle cerebral arterie occlusion (MCAO) beschrieben, (Carmichael 2005, Niv et al. 2012). Bereits kurze Zeit nach der induzierten Ischämie kommt es zu einem Anstieg bestimmter Vorläuferzellen in der SGZ des Hippocampus, die zu reifen Neuronen ausdifferenzieren (Kunze et al. 2006).

Die vermehrte Neurogenese kann durch Interventionen verändert werden. So zeigt sich im Rahmen von rehabilitativem Training im Sinne einer Beübung der gelähmten Extremität, Laufradtraining und reizreicher Umgebung eine weitere Steigerung der Zahl der ABN nach Schlaganfall (Wurm et al. 2007, Luo et al. 2007, Matsumori et al. 2006, Geibig et al. 2012, Sun et al. 2019). Mittlerweile wurde eine Vielzahl, der im Rahmen der cerebralen Schädigung ausgeschütteten, biochemischen Faktoren in Beziehung zu diesem Phänomen gesetzt (Hazell 2007, Lindvall und Kokaia 2015).

Neben der post-ischämischen Steigerung der Vorläuferpopulationen und der neugebildeten Neuronen konnte außerdem eine vermehrte Anzahl morphologisch veränderter aberranter Neuronen festgestellt werden (Niv et al. 2012). Unter MCAO

konnte dabei ein Anteil von 10 % gefunden werden, wohingegen unter physiologischen Bedingungen nur circa 1 % der Neuronen diese morphologischen Abweichungen aufweisen (Niv et al. 2012). Als aberrante Nervenzellen werden bipolare Neuronen mit einem zusätzlichen basalen Dendriten oder Zellen mit einer ektopen Lage des Zellkerns außerhalb des Gyrus dentatus (meist im Hilus) bezeichnet (Abb. 3) (Parent et al. 1997, Ribak et al. 2000). Eine aberrante Neurogenese lässt sich auch nach den anderen Neurogenese-induzierenden cerebralen Pathologien wie traumatischen Hirnschädigungen und Epilepsie nachweisen (Bielefeld et al. 2019). Insbesondere nach epileptischen Anfällen können sehr hohe Raten von bis zu 34 % nachgewiesen werden (Jessberger et al. 2007a). Die aberranten Neuronen werden in das bestehende Netzwerk integriert (Parent et al. 1997, Jessberger et al. 2007a, Walter et al. 2007, Niv et al. 2012). Diese Integration führt zu einer Beeinflussung des bestehenden Netzwerks und wird mit kognitiven Verschlechterungen und Epileptogenese in Verbindung gebracht (Cho et al. 2015, Jessberger und Parent 2015, Bielefeld et al. 2019).



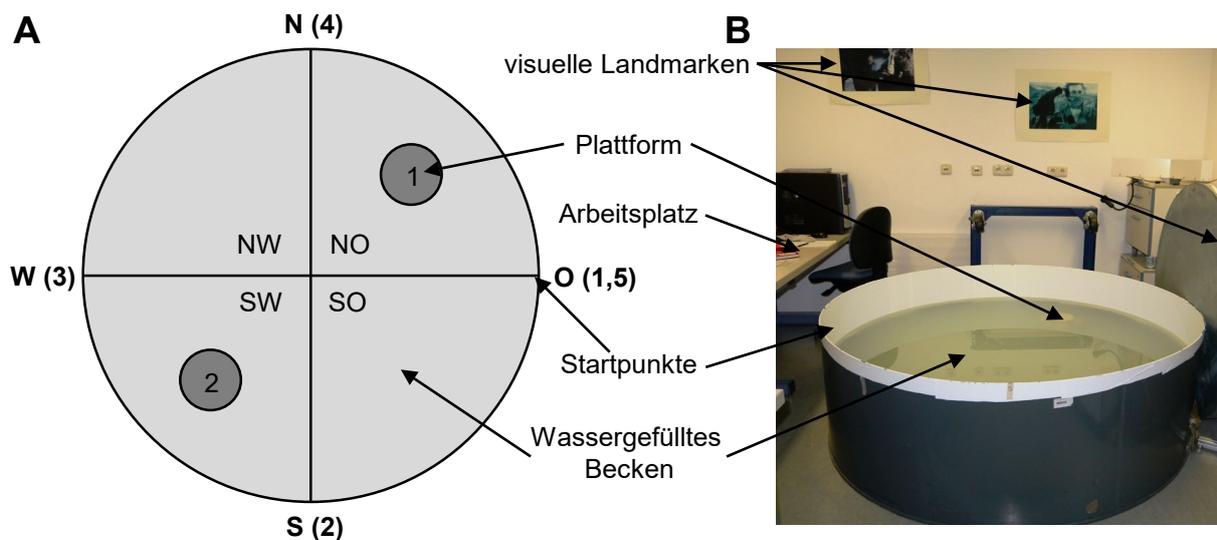
**Abb. 3:** Darstellung regulär- und aberrant-integrierter Neuronen. Von links nach rechts: Erstes Neuron ist regelrecht-integriert mit apikalem Dendritenbaum, basalem Axon und einer Lage in der GZS dargestellt. Rechts davon ist eine aberrante bipolare Zelle mit zusätzlichem basalem Dendritenbaum. Am rechten Bildrand ist eine ektop im Hilus liegendes Neuron dargestellt.

## 4.6 Neurogenese und Kognition

Die ABN werden nach ihrer Integration in die Funktionen des Hippocampus eingebunden (Shors et al. 2002). Da der Hippocampus entscheidende kognitive Funktionen im Gehirn, insbesondere im Lernverhalten und im Erinnerungsvermögen, einnimmt, ist davon auszugehen, dass die neuen Neuronen diese Prozesse beeinflussen (O'Keefe und Nadel 1978, Eichenbaum 2000). Dabei wurden verschiedene Verhaltensexperimente mit Nagern unter Beeinflussung der Neurogenese durchgeführt, wobei sich insbesondere eine Veränderung der Fähigkeit zur räumlichen Orientierung und zur Mustererkennung darstellte (Shors et al. 2002, Dupret et al. 2007, Sahay et al. 2011, Rangel et al. 2014). Bisherige Forschungsergebnisse zeigen eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten nach einer Steigerung der Neurogenese und eine Verschlechterung nach Ablation (Gould et al. 1999, van Praag et al. 1999b, Leuner et al. 2006, Saxe et al. 2006, Imayoshi et al. 2008, Clelland et al. 2009, Jessberger et al. 2009, Toda und Gage 2018). Bei Reduktion der Neurogenese konnte eine Verschlechterung der kognitiven Funktion durch verschiedene Verhaltensexperimente zur räumlichen Orientierung wie dem Barnes Maze, Radial Arm Maze und dem Morris Water Maze oder zum Erinnerungsvermögen wie dem Context Fear Conditioning, Object Recognition Task und dem Eyeblink Conditioning nachgewiesen werden. Insbesondere das Morris Water Maze (MWM), bei dem die Nagetiere eine versteckte Plattform in einem Wasserbecken finden müssen, wurde als Test der räumlichen Orientierung etabliert (van Praag et al. 1999b, Deng et al. 2009, Garthe und Kempermann 2013). So kam es zu einer Verbesserung der Leistungen im MWM nachdem die Neurogenese von Nagern durch körperliche Aktivität mit Hilfe einer Laufradhaltung gesteigert wurde (van Praag et al. 1999b, van Praag et al. 2005). Eine Reduktion der Neurogenese führte hingegen zu Lerndefiziten in dem Test (Dupret et al. 2008, Jessberger et al. 2009). Auch pathologische Stimuli der Neurogenese wurden mit dem Verhaltenstest untersucht. Nach Induktion von Schlaganfällen und Epilepsie konnte eine Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten trotz gesteigerter Neurogenese nachgewiesen werden (Markgraf et al. 1992, Luo et al. 2007, Zhao et al. 2009, Fares et al. 2013, Han et al. 2016, Jin et al. 2017, Svensson et al. 2017).

Modifikationen am Morris Water Maze ermöglichten die Detektion von Umlernen bzw. von flexiblem Lernen (Garthe und Kempermann 2013, Garthe et al. 2014). Diese speziellen Lernformen wurden als spezifische Funktion der neugebildeten Neuronen

publiziert (Garthe et al. 2009, Garthe et al. 2014). Die ABN werden dabei nach derzeitigem Kenntnisstand für eine flexible Anpassung an neue Situationen diskutiert (Garthe et al. 2009). In Studien mit diesem neuen Paradigma führte eine Deletion der Neurogenese zu einer deutlichen Verschlechterung dieses Umlernens (Garthe et al. 2009, Garthe et al. 2014). Bei einer vermehrten Anzahl an ABN, durch Haltung in einer reizreichen Umgebung, konnte so eine Verbesserung des Umlernens detektiert werden (Garthe et al. 2009, Garthe et al. 2014, Garthe et al. 2016).



*Abb. 4 Schematische und bildliche Darstellung des Versuchsaufbaus des modifizierten MWM nach Garthe et al, 2009 A: Darstellung der Plattformpositionen, der Quadranten und der verschiedenen Startpunkte (jeweiliger Tag in Klammern hinter den Himmelsrichtungen). B: Photographie des Versuchsraums mit Wasserbecken, Plattform, Landmarken und Arbeitsplatz.*

## 5 Zielstellung

Der Schlaganfall führt nicht nur im Bereich der Infarktumgebung zu massiven zellulären Veränderungen, sondern auch in Hirnregionen, die primär nicht von der Läsion betroffen sind, wie der Gyrus dentatus der Hippocampusformation. Der Gyrus dentatus gehört zu den wenigen neurogenen Nischen des erwachsenen Gehirns. Der Schlaganfall löst innerhalb von Stunden einen massiven Proliferationsanstieg verschiedener Vorläuferpopulationen aus, die zu einer signifikant gesteigerten Neurogenese innerhalb von sechs Wochen führen. Diese postischämische Neurogenese ist von der Bildung aberrant-integrierter Neuronen begleitet, die einen bipolaren Dendritenbaum aufweisen oder ektop in den Hilus migrieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen der postischämischen Neurogenese und dem Hippocampus-abhängigen räumlichen Lernvermögen nach Schlaganfall untersucht werden. Im Weiteren sollte der Einfluss von körperlicher Aktivität (Laufradhaltung) als Form eines rehabilitativen Trainings auf die postischämische Neurogenese und das räumliche Gedächtnis analysiert werden.

Es stellten sich folgende Fragen:

- Geht die erhöhte Neurogenese nach dem Schlaganfall mit einer Verbesserung oder Verschlechterung des räumlichen Gedächtnisses einher?
- Wie hoch ist der Anteil von neugebildeten aberranten Nervenzellen?
- Inwieweit beeinflusst Laufradtraining die post-ischämische Neurogenese?
- Inwieweit verändert Laufradtraining die Bildung aberranter Neuronen?

Für die Beantwortung der Fragen wurden experimentell-induzierte Schlaganfälle mit Hilfe des MCAO-Modells ausgelöst. Anschließend wurden die Tiere in Käfigen mit oder ohne Laufräder gehalten. Die Analyse der neugebildeten Neuronen erfolgte mit Hilfe des intraperitoneal applizierten Proliferationsmarkers EdU und retroviralen GFP-gekoppelten Vektoren, die nur in teilenden Zellen nach intrahippocampaler Injektion nachweisbar sind. Zur Beurteilung des räumlichen Gedächtnisses wurde ein spezieller modifizierter Test des Morris Water Maze eingesetzt, der es erlaubt, spezifische Hippocampus-abhängige Defizite zu detektieren, die als Folge von Änderungen der Neurogenese im Gyrus dentatus auftreten.

## 6 Publierte Originalarbeit

**Adult hippocampal neurogenesis poststroke: more new granule cells but aberrant morphology and impaired spatial memory.** Voitke F, Ceanga M, Rudolph M, Niv F, Witte OW, Redecker C, Kunze A, Keiner S. **PLoS One** 2017; 12 (9): e0183463. Published online. doi: 10.1371/journal.pone.0183463; 2017 Sep 14

RESEARCH ARTICLE

# Adult hippocampal neurogenesis poststroke: More new granule cells but aberrant morphology and impaired spatial memory

Florus Voitke, Mihai Ceanga, Max Rudolph, Fanny Niv, Otto W. Witte, Christoph Redecker, Albrecht Kunze\*<sup>‡</sup>, Silke Keiner<sup>‡</sup>

Hans Berger Department of Neurology, Jena University Hospital, Am Klinikum 1, Jena, Germany

<sup>‡</sup> These authors contributed equally to this work.

\* [albrecht.kunze@med.uni-jena.de](mailto:albrecht.kunze@med.uni-jena.de)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Voitke F, Ceanga M, Rudolph M, Niv F, Witte OW, Redecker C, et al. (2017) Adult hippocampal neurogenesis poststroke: More new granule cells but aberrant morphology and impaired spatial memory. PLoS ONE 12(9): e0183463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183463>

**Editor:** Robert Sutherland, University of Lethbridge, CANADA

**Received:** December 8, 2016

**Accepted:** August 4, 2017

**Published:** September 14, 2017

**Copyright:** © 2017 Voitke et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** The data are deposited on figshare (DOI: [10.6084/m9.figshare.5350753](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5350753)).

**Funding:** Financial support was received from the BMBF program “Cell-based, regenerative therapies,” 01GN0977; and the Interdisciplinary Center for Clinical Research (IZKF) Jena.

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

## Abstract

Stroke significantly stimulates neurogenesis in the adult dentate gyrus, though the functional role of this postlesional response is mostly unclear. Recent findings suggest that newborn neurons generated in the context of stroke may fail to correctly integrate into pre-existing networks. We hypothesized that increased neurogenesis in the dentate gyrus following stroke is associated with aberrant neurogenesis and impairment of hippocampus-dependent memory. To address these questions we used the middle cerebral artery occlusion model (MCAO) in mice. Animals were housed either under standard conditions or with free access to running wheels. Newborn granule cells were labelled with the thymidine analogue EdU and retroviral vectors. To assess memory performance, we employed a modified version of the Morris water maze (MWM) allowing differentiation between hippocampus dependent and independent learning strategies. Newborn neurons were morphologically analyzed using confocal microscopy and Neurolucida system at 7 weeks. We found that neurogenesis was significantly increased following MCAO. Animals with MCAO needed more time to localize the platform and employed less hippocampus-dependent search strategies in MWM versus controls. Confocal studies revealed an aberrant cell morphology with basal dendrites and an ectopic location (e.g. hilus) of new granule cells born in the ischemic brain. Running increased the number of new neurons but also enhanced aberrant neurogenesis. Running, did not improve the general performance in the MWM but slightly promoted the application of precise spatial search strategies. In conclusion, ischemic insults cause hippocampal-dependent memory deficits which are associated with aberrant neurogenesis in the dentate gyrus indicating ischemia-induced maladaptive plasticity in the hippocampus.

## Introduction

Ischemic brain insults are a leading cause of mortality and chronic disability in humans. In addition to causing a broad spectrum of physical symptoms, stroke increases the risk of dementia and brings about a steeper decrease in cognitive function in elderly people [1].

Recent studies support this concept and provide evidence that stroke impairs hippocampal function and accelerates age-associated memory decline in humans although the insults do not primarily affect the temporal lobe [2,3]. The cellular mechanisms of how ischemic infarcts cause alteration of hippocampal function are only partially understood.

The hippocampus is one of the neurogenic regions of the adult brain where neurons are continuously generated throughout life. The new granule cells (GC) are born in the subgranular zone of the dentate gyrus (DG), migrate in the granule cell layer, and become functionally integrated into neuronal networks within four to six weeks. The generation and integration seems to be strictly regulated and aberrant GC are extremely rare (< 1%) in the intact brain [4]. Analysis of the function of the newly born GCs has been challenging in the past but recent studies reveal that they are centrally involved in the formation and retrieval of spatial memories, particularly in the separation of complex visual patterns [5–7].

Ischemic insults stimulate adult neurogenesis in the DG [8]. However, the presence of more new neurons in the ischemic brain is not reliably associated with better outcome in memory tasks [9]. Recent findings even suggest that a significant portion of newborn neurons generated in the context of stroke reveal aberrant morphology and fail to correctly integrate into pre-existing networks [10]. Thus, stroke might rather negatively affect adult neurogenesis and subsequently impair spatial learning in mice.

In the present study, we asked the question of whether more new neurons are generated in the DG of mice with focal infarcts and whether they reveal specific hippocampus-dependent memory deficits in behavioural testing. And if so, whether there is evidence for aberrant hippocampal neurogenesis following stroke? To answer these questions, we employed a modified version of the Morris water maze that allows assessment of spatial memory and differentiation of hippocampus-dependent versus hippocampus-independent search strategies [11]. Notably, neurogenesis does not appear to be beneficial for hippocampal memory per se but rather contributes to highly specific functional aspects of spatial learning. Hence, the modified MWM includes specific features (complex visual landmarks, no curtain, goal reversal after day 4) which challenge the function of newly generated neurons [7,12,13].

Quantification and morphological analysis of new neurons was performed following distinct labeling techniques with retroviral vectors or with the thymidine analogue 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU). In a second set of experiments, we used running as a strong neurogenic stimulus and investigated whether this further enhances neurogenesis and possibly improves memory performance poststroke.

## Methods

### Animals and stroke model

The study was performed on a total number of 40 adult male C57BL/6J mice (11 to 15 weeks of age, 19–28 g). Animals were purchased from Charles River (Sulzfeld, Germany) and bred in our local facilities. Twenty-four animals received ischemic infarcts and 16 animals were sham operated. Infarcts were induced by using the middle cerebral artery occlusion model (MCAO). Briefly, mice were anesthetized with 2.5% isoflurane in a N<sub>2</sub>O:O<sub>2</sub> (3:1) mixture. Through a middle neck incision the right common carotid artery (CCA), the external carotid artery (ECA) and the internal carotid artery (ICA) were carefully dissected from surrounding nerves and fascia. The left common and external carotid artery was occluded with a 7.0-polyfilament (Medicon eG, Tuttlingen, Germany) and subsequently an arteriotomy was performed in the common carotid artery. A 6.0-monofilament suture (Docol cooperation, Sharon, MA) with a rounded tip was inserted into the common carotid artery and advanced through the internal carotid artery to the ostium to occlude the middle cerebral artery. After 45 minutes, the suture

was removed, the wound was closed, and the mice were allowed to recover. During the MCA occlusion body temperature was maintained at physiological level using a heating pad. Sham animals underwent anesthesia and surgical procedure in a similar manner to the treatment group with exception of occlusion of the middle cerebral artery.

The study was carried out in strict accordance with the recommendations of the European Commission on the protection of animals used for scientific purposes. All experimental procedures were performed according to the ARRIVE guidelines [14] and approved by the local specific authority for regulating animal experimentation (Landesamt für Verbraucherschutz, Bad Langensalza, Thuringia, Germany, Permit Number 02-053/12). All surgeries were carried out under isoflurane anesthesia, and all efforts were made to minimize the suffering of animals. Postoperative care included monitoring animals twice daily. The application of analgesics was not necessary. No adverse events occurred during postoperative care.

### Retroviral vectors

To label newly generated granule neurons, we used the retroviral vectors CAG-green fluorescent protein (GFP) or CAG-red fluorescent protein (RFP)[10]. The viral vectors were developed from a murine moloney leukemia virus and were produced by cotransfecting HEK 293 T cells with the compound promotor CAG, the reporter Gens GFP or RFP, the CMV enhancer protein, the coating glycoprotein of rabies virus VSV-G and the posttranscriptional regulator element Woodchuck Hepatitis-Virus (WPRE). The final titer reached was approximately  $1 \times 10^7$  colony-forming units/mL.

### Experimental design

Adult mice were randomly allocated to four experimental groups (S1 Fig). Mice either underwent MCAO in the left hemisphere or were sham operated at day 0. Following surgery they were either housed under standard conditions or had free access to a running wheel for 7 weeks: 1. MCAO and standard housing (MCAO-ST,  $n = 12$ ). 2. MCAO sham surgery and standard housing, (Sham-ST,  $n = 8$ ). 3. MCAO and running wheel (MCAO-RU,  $n = 12$ ). 4. MCAO sham surgery and running wheel (Sham-RU,  $n = 8$ ). Four days after stroke mice were anesthetized and stereotactically injected with 1  $\mu$ l of CAG-GFP retrovirus into the dentate gyrus (coordinates from the bregma were,  $x = 3.1$  mm;  $y = 1.5$  mm;  $z = 4.0$  mm). Additionally, mice received daily injections of thymidine analogue, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, 50 mg/kg) from days 3 to 15.

### Morris water maze (MWM)

At six weeks poststroke, mice were trained in the reference memory version of the Morris water maze task to locate a hidden escape platform in a circular pool (1.80 m diameter). Water was made opaque with a non-toxic white milk powder and kept at a temperature of 20–21 °C. Each mouse underwent 6 trials per day for 5 consecutive days with an inter-trial interval (ITI) of 30 mins. Mice were released from one of four possible starting points and allowed to search for up to 120 s for the platform. The starting position remained constant each day. If mice did not find the platform within 120 s, they were guided to the platform and allowed to remain there for at least 15 s. On day 4, the platform was moved to the opposite northwestern quadrant (reversal) where it also remained on day 5. Probe trials lasting 60 s were performed on day 4 (before starting the reversal learning) and on day 5 (after finishing reversal learning) without a platform, respectively. Swim paths were recorded using VideoMod 2 (TSE Version 6.04; Rosstock, Deutschland) and further analyzed using Matlab (The Mathworks, USA).

## Tissue preparation and immunocytochemistry

At day 46 animals were deeply anesthetized with isoflurane and perfused through the ascending aorta with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (0.15 mol/L, pH 7.4). Following perfusion brains were postfixed in paraformaldehyde and sliced into 40- $\mu$ m sections. EdU staining was conducted using Click-iT™ EdU imaging kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to a modified manufacturer's protocol. After washing the slices were incubated for 1 hour using a Click-iT™ reaction cocktail containing Click-iT™ reaction buffer, CuSO<sub>4</sub>, Alexa Fluor® 555 Azide, and reaction buffer additive.

In addition, immunofluorescence standard methods were applied to double-, triple- or quadruple-label cells as previously described [15]. The following primary and secondary antibodies were used: goat anti-GFP antibody (1:500; Acris, Herford, Germany), rat anti-RFP antibody (1:500; Abcam, Cambridge, UK), mouse antineuronal nuclei antigen (1:500; Chemicon, Temecula, CA), Cy5 antimouse (1:500; Dianova, Hamburg, Germany), Alexa Fluor 488 anti-goat (1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA) and Rhodamine antirat (1:500; Dianova, Hamburg, Germany). Additionally, 6-diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI, Sigma–Aldrich-Chemie) was employed for nuclear staining in immunofluorescence.

Immunofluorescence stainings were analyzed by confocal laser scanning microscopy and peroxidase stained cells were evaluated by light microscopy.

## Quantification and statistical analysis

Basic analysis of MWM included quantification of latencies (time to find the platform), distance (path lengths) and time that animals spent in the quadrants. Further detailed analyses were undertaken based on the raw time-tagged *xy*-coordinates using Matlab, Version 2012b (The Mathworks, Ismaning, Germany). Search strategies were classified according to parameters and an algorithm previously described by Garthe et al. [11]. EdU imaging Kit stained sections were analysed by using confocal fluorescence microscopy (LSM 710, Carl Zeiss Jena, Germany) with an 40 $\times$  objective. EdU+ cells were counted on every sixth section (240  $\mu$ m intervals) of the complete ipsi- and contralateral dentate gyrus (DG) for subgranular zone (SGZ) and granule cell layer (GCL) The SGZ was defined as a two cell soma thin layer between the GCL and the hilus in line with previous reports (Jin et al., 2001; Walter et al., 2010). Colocalisation studies of multiply labeled fluorescence sections were performed by using confocal microscopy (LSM 710, Carl Zeiss Jena, Germany).

To quantify neurogenesis, the phenotypes of EdU+ cells of both hippocampi were analyzed on every sixth section (240  $\mu$ m interval) from the complete rostro-caudal extension of the dentate gyrus according to their coexpression of EdU and NeuN. Total numbers of newly generated neurons were then determined by calculating the ratio of the percentage of EdU+/NeuN+ cells to the total number of immunofluorescence stained EdU+ cells in the dentate gyrus.

To analyze phenotype and dendritic complexity of the virus-labeled cells, we employed confocal microscopy, z-stack imaging and the semiautomatic NeuroLucida system (MicroBrightfield, Colchester, VT) as previously reported [10]. Neurons with aberrant morphology were defined as: 1) bipolar cells in the granule layer of the DG with basal dendritic processes directed toward the hilus; and (2) ectopically positioned cells located either beneath the subgranular zone in the hilus or in the extension of the adjacent CA region.

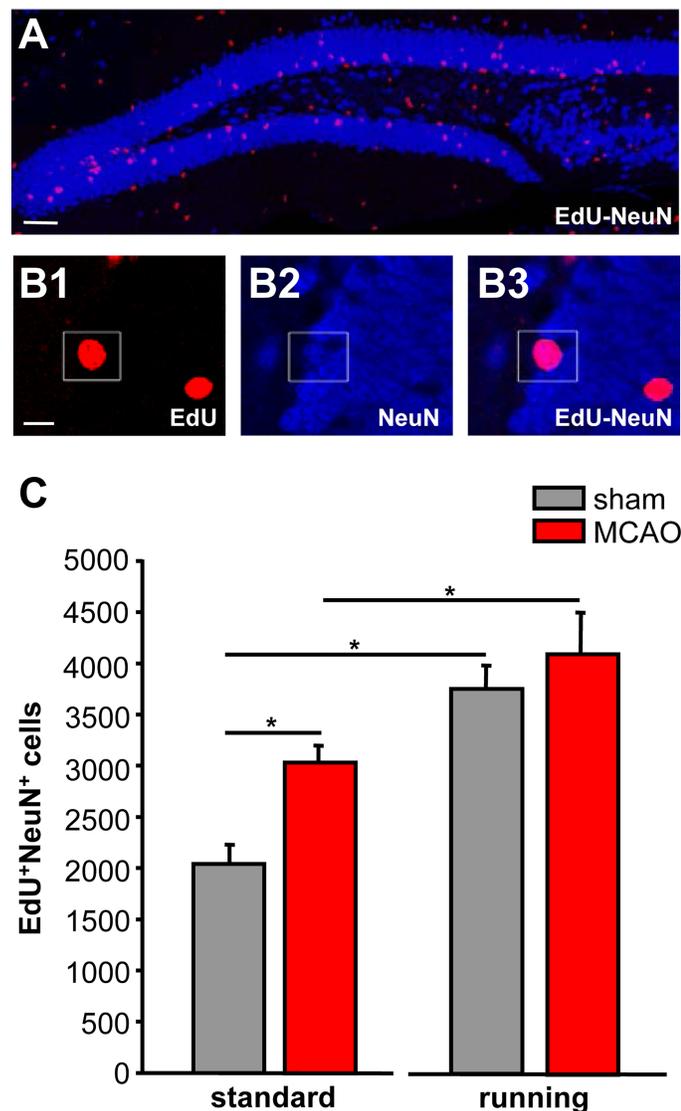
Statistical analyses were performed using SPSS 22.0 for Windows. Differences were assessed using one way analysis of variance (ANOVA) and post hoc Bonferroni correction for multiple testing (Comparison of cell numbers, Fig 1), ANOVA for repeated measurements (Comparisons of latencies and distance in MWM, Fig 2) and general equation estimation (GEE, comparison of strategies in MWM, Figs 3 and 4) that allows estimation of odds ratios. Data are

given as mean  $\pm$  SEM unless otherwise noted. P values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

## Results

### Morphology of the ischemic infarcts

All animals analyzed in the MCAO subgroups showed typical focal infarcts covering the basal ganglia in the left middle cerebral artery territory (S1 Fig). The median infarct volume was  $6.88 \pm 3.40 \text{ mm}^3$  ( $n = 11$ ). It did not significantly differ between the MCAO-ST and MCAO-RU groups. Animals with extended ischemic damage affecting the hippocampus were excluded from the analysis ( $n = 4$ ).



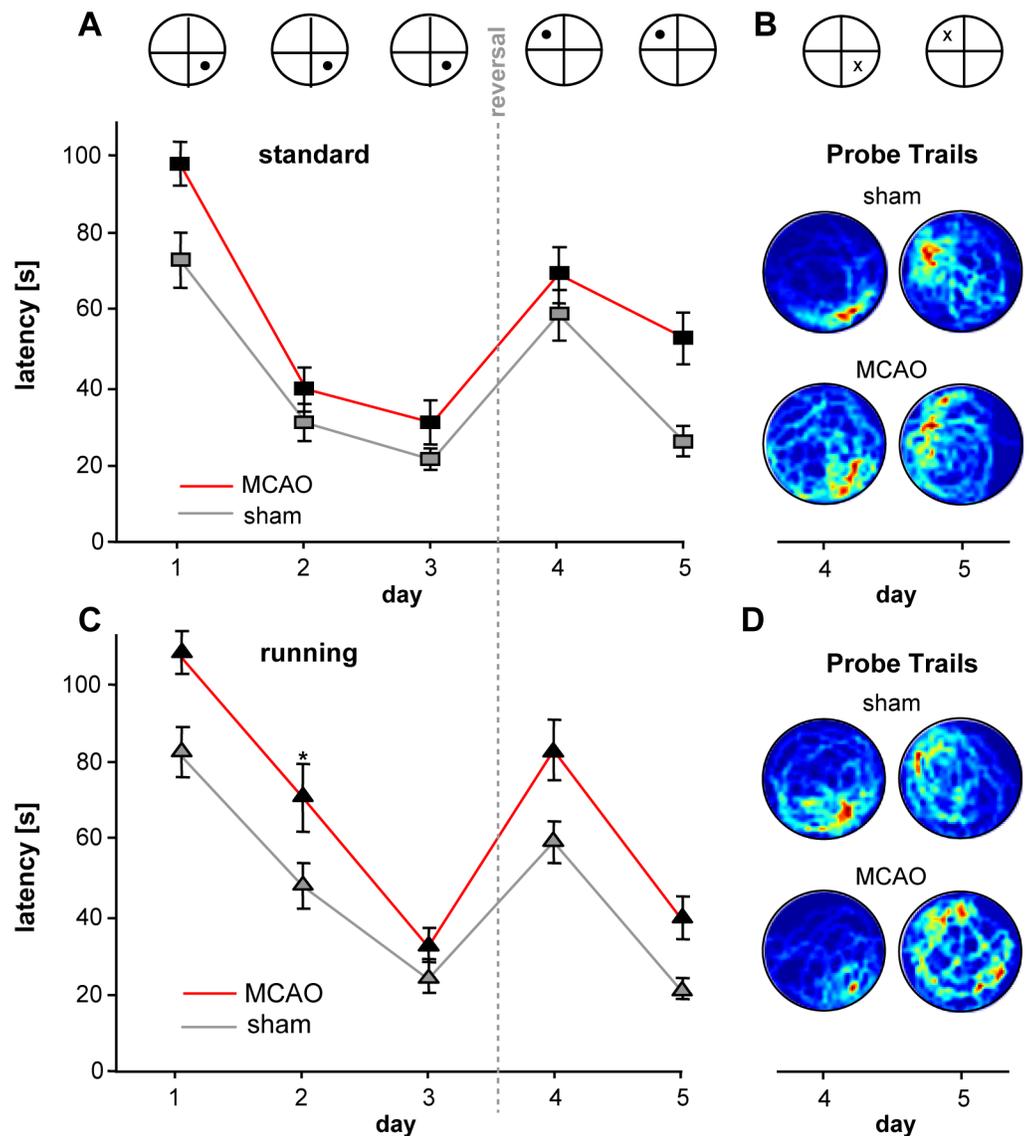
**Fig 1. Stroke stimulates neurogenesis in adult dentate gyrus.** **A**, Representative confocal image of dentate gyrus with newly generated neurons (red). **B**, Higher magnification of new neurons show colabeling of proliferation marker EdU (red) and mature neuronal marker NeuN (blue). **C**, Quantification of new neurons in animals housed under standard conditions or with free access to running wheels. Bars represent mean  $\pm$  SEM. Asterisks indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Scale bars represent  $100 \mu\text{m}$  (A1),  $10 \mu\text{m}$  (B1).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183463.g001>

### Stroke significantly increases hippocampal neurogenesis

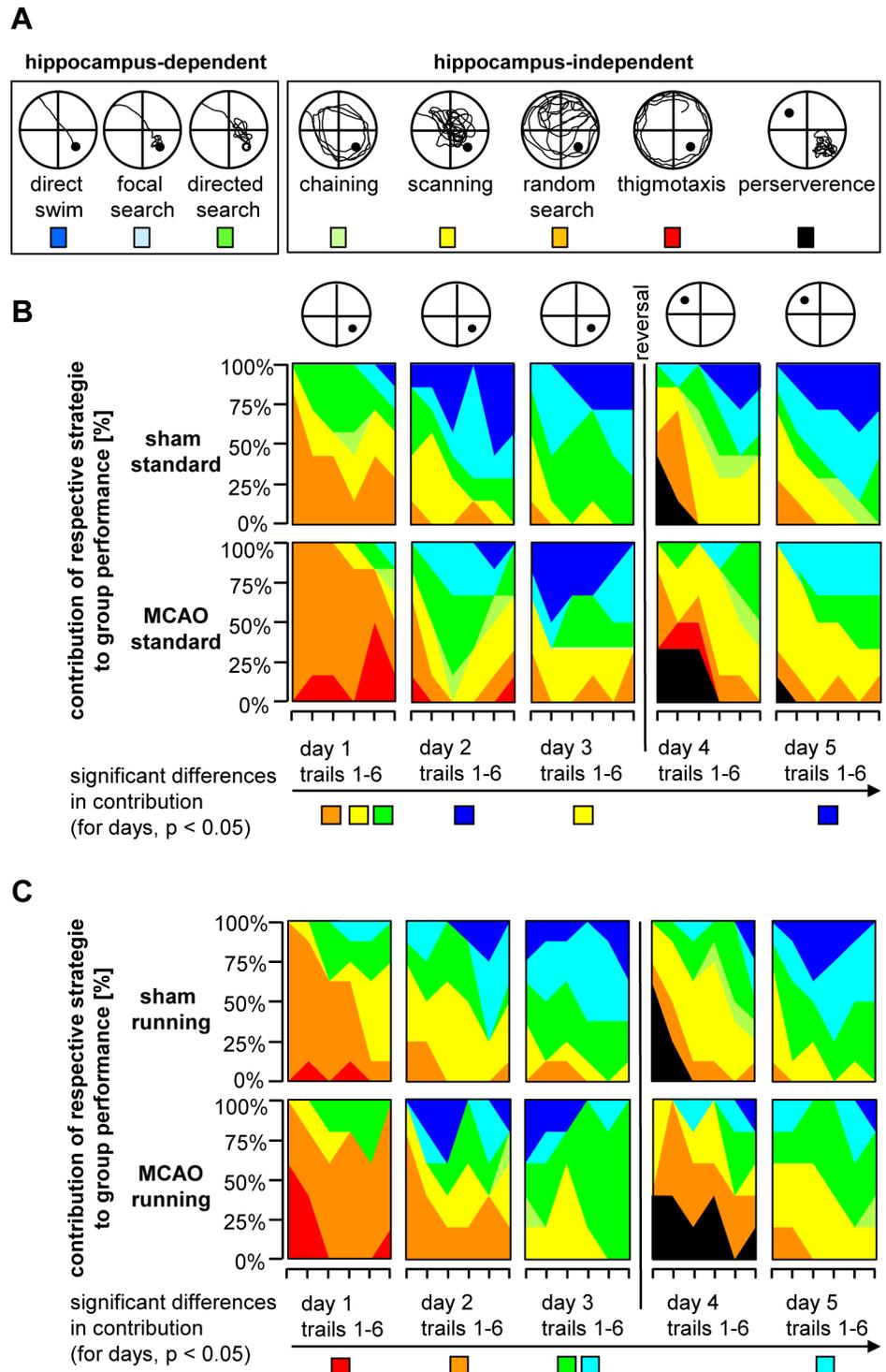
To quantify neurogenesis in adult DG following stroke, we analyzed the number of EdU positive cells which coexpressed the neuronal marker NeuN using confocal microscopy (Fig 1). The thymidine analogue EdU is incorporated by dividing precursor cells and remains immunohistochemically detectable following their differentiation into neurons (Fig 1A). Quantification of EdU+/NeuN+ cells revealed a significantly higher number of new neurons at day 49 following stroke versus control (1.5-fold,  $p < 0.002$  versus Sham-ST, Fig 1B). No significant difference was observed between the ipsi- and contralateral side in stroke or control animals.

In a second set of experiments, we used running to stimulate neurogenesis and carried out a similar quantification of EdU+/NeuN+ coexpression. Therefore, animals were housed in



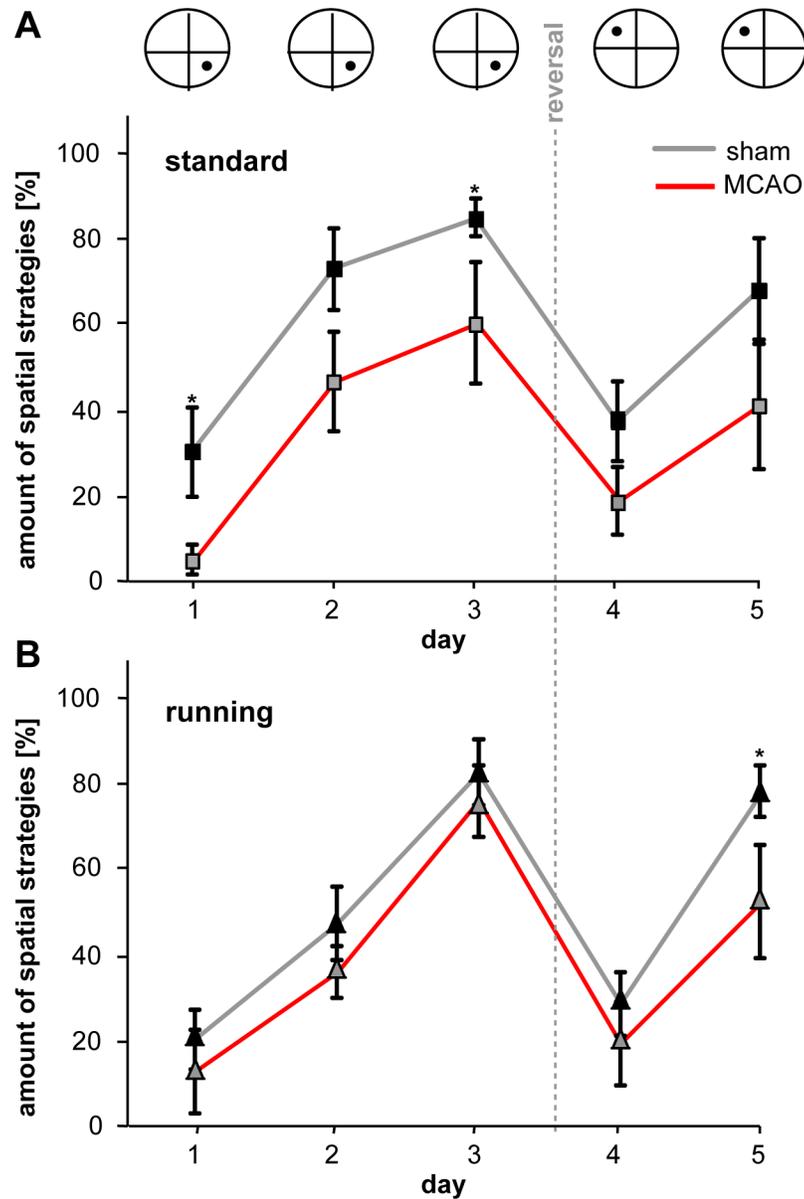
**Fig 2. Spatial learning is impaired following stroke.** A/C, Graphs reveal time (latencies) to navigate to the platform in MWM either following standard housing (A) or free access to running wheels (C), red = MCAO, grey = sham. B/D Heat maps of probe trails at days 4 and 5. Dark-red zones indicate a high presence probability. In the upper panel of A-B, the platform position is schematically illustrated. During the probe trails, the platform is removed and the putative position is marked with x.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183463.g002>



**Fig 3. Stroke animals employ less hippocampus-dependent search strategies.** **A**, Schematic illustration of distinct hippocampus-dependent and -independent search strategies in MWM. **B/C**, Contribution of single search strategies to group performance in MCAO- and sham operated animals either following standard housing (B) or free access to running wheels (C). Color code as indicated in A.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183463.g003>



**Fig 4. Contribution of pooled hippocampus-dependent search strategies.** A/B, Graph depicts percentage of all hippocampus-dependent strategies (direct swim, focal search, directed search) in MCAO- and sham-operated animals either following standard housing (A) or free access to running wheels (B). Graphs represent mean  $\pm$  SEM. Asterisks indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183463.g004>

cages with free access to running wheels. The number of EdU+/NeuN+ cells was significantly increased in both running groups compared with animals housed under standard conditions (Fig 1B). Quantification yielded 1.32-fold increase in MCAO-RU ( $p < 0,05$  versus MCAO-ST) and 1.89-fold increase in sham operated runners ( $p < 0,001$  versus Sham-ST, Fig 1B).

### Stroke impairs spatial learning in Morris water maze

Next, we related our morphological results to behavioral data. To assess spatial memory following stroke, we trained our animals using a reference memory version of the MWM task

with 6 trials per day for 5 days and a new platform position (reversal) on the beginning of day 4 [11]. The experimental set up of MWM included a high number of complex visual landmarks around the pool (e.g. different photographs with landscapes) and no curtain around the pool. Consequently mice were required to apply learning strategies that are more dependent on hippocampal neurogenesis [13].

In the first step, we analyzed the basic parameter of MWM comprising latencies (“time to find the platform”) and distance (“path lengths”) that mice needed to navigate to the platform. We found that following stroke mice generally needed more time to locate the platform. The longer latencies were detected throughout all five days during the acquisition and reversal period in stroke animals. The most prominent difference was observed at day 5 (26.73 sec) after goal reversal in MCAO-ST versus Sham-ST. The comparison of latencies between MCAO-ST and Sham-ST over 5 days reached statistical significance ( $p = 0.026$ ,  $F_{6,607}$ , ANOVA with multiple measures, Fig 2A). The length of the swim path in stroke animals was also significantly increased in MCAO-ST versus Sham-ST ( $p = 0.042$ ,  $F_{5,318}$ ). Notably, the swim speed was not different in both groups ( $p = 0.904$ ,  $F_{0,015}$ , ANOVA with multiple measures).

Considering the latencies in both running groups, running did not improve the performance but even induced a more pronounced difference between stroke and control animals (Fig 2B, MCAO-RU vs Sham-RU,  $p = 0.010$ ,  $F_{9,733}$ ).

In general, post hoc analysis yielded consistently shorter distances and latencies in all animals on day 3 compared to day 1 indicating a general successful task acquisition.

Comparing both controls, Sham-ST versus Sham-RU, we found no difference in the latencies ( $p = 0.492$ ,  $F_{0,499}$ , ANOVA using multiple measures). A similar result was obtained by comparing the latencies in both stroke groups, MCAO-ST versus MCAO-RU ( $p = 0.239$ ,  $F_{1,593}$ ).

In summary, analysis of latencies and distance indicate that stroke animals show an impairment of spatial memory in the MWM despite the animals having a higher number of new neurons in the dentate gyrus.

In the next step, we investigated the quality of spatial learning. First, we plotted the probability of presence in the circular water maze at day 4 and could visualise a slower reversal learning in stroke animals (Heatmaps, Fig 2B). Second, we analyzed both the efficacy of the chosen search strategies and also whether the animals used more hippocampus-dependent or -independent strategies to locate the platform (Fig 3). The classification of search strategies was performed by using a mat lab algorithm as reported previously [11]. Statistical analysis employing generalized estimation equation revealed that in the acquisition phase, MCAO-ST used spatial strategies such as direct swimming, focal search, and the direct search significantly less frequently compared to the control (Fig 3). The estimated odds ratios yielded a >3-fold higher relative probability for controls (Sham-ST) to use spatial navigation from D1 to D3 (OR 7.62,  $p = 0.008$  on D1, OR 3.15,  $p = 0.067$  on D2, OR 3.82,  $p = 0.034$  on D3, summarized in Fig 4). Analyzing all three hippocampus-dependent strategies following reversal of the platform, we found a robust trend showing that Sham-ST also used more specific spatial navigation versus MCAO-ST, however no significant difference was detected (OR 2.55,  $p = 0.11$  on D4, OR 3.12,  $p = 0.13$  on D5, Fig 4). On considering single strategies, we observed that direct swimming as the most efficient navigation to the platform was only employed by Sham-ST and not by MCAO-ST mice on days 4 and 5 indicating a important difference between both groups (Fig 3B). Taken together, analysis of single strategies unveils that stroke particularly decreases the application of hippocampus-dependent strategies in MWM.

Next we analyzed whether running as strong neurogenic stimulus might affect spatial learning in MCAO or sham-operated animals. We found that mice living in cages with free access to running wheels following MCAO still revealed an impaired memory performance although

they experienced a further increase of new neurons in the DG. The latencies in the MWM between MCAO-RU and MCAO-ST were not significantly different from D1 to D5 ( $p = 0.239$ ,  $F 1.593$ , Fig 2). The sham operated runners (Sham-RU) also needed almost identical times to localize the platform during acquisition and reversal similar to sham animals housed under standard conditions (Sham-ST,  $p = 0.492$ ,  $F 0.499$ , Fig 2). Hence, running revealed no significant effect on the latencies in both control and stroke animals.

Analyzing the strategies in both running groups, animals with stroke (MCAO-RU) used a less efficient navigation strategy to find the platform. Hippocampal-dependent strategies were employed more frequently by the Sham-RU. The odds ratios calculated by general equation estimation were constantly  $> 1$  but significance was reached only at day 5 (OR 2.37,  $p = 0.419$  on D1, OR 1.59,  $p = 0.289$  on D2, OR 1.52,  $p = 0.532$  on D3, OR 1.65,  $p = 0.437$  on D4, OR 3.32,  $p = 0.042$  on D5). The MCAO-RU rarely employed the efficient hippocampus-dependent strategies “direct swimming and focal search” particularly after goal reversal (Fig 3B). Here, focal search was used with a 2.96-fold higher probability by Sham-RU ( $p = 0.017$ ). Similarly direct swimming was applied at 4.95-fold (OR) but the difference was not statistically significant ( $p = 0.118$ ). However, the number of totally applied spatial strategies in the runnings groups compared to standard housing is more alike mainly during the acquisition phase (Fig 4). This finding indicates a beneficial effect of running on spatial memory following ischemia.

Thus, running does not improve the performance of MWM in general but promotes the application of spatial strategies in the acquisitions phase following ischemic insults.

## Impaired spatial memory performance correlates with aberrant hippocampal neurogenesis

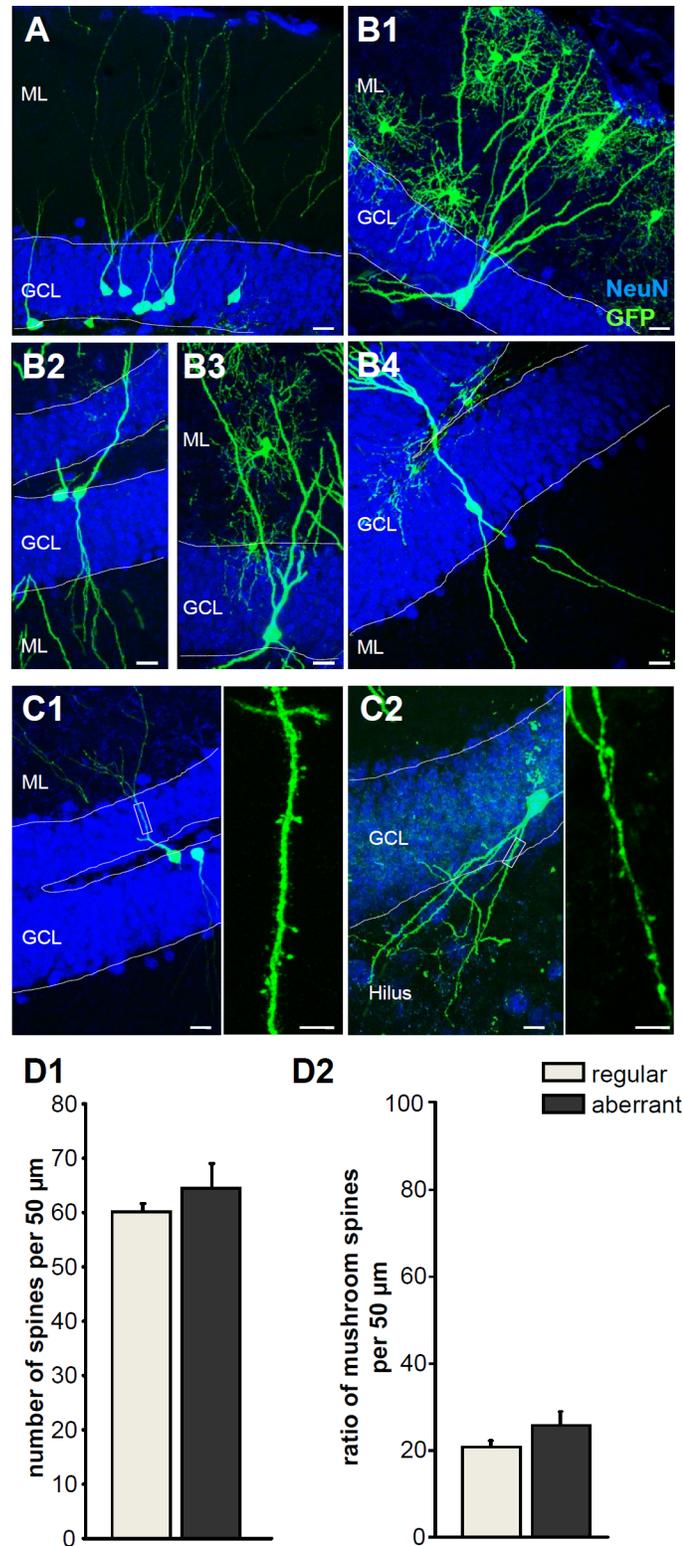
In another set of experiments we addressed the question of whether the newly generated neurons reveal an aberrant morphology and location which is associated with malfunction of the hippocampal network [16,17]. In the intact brain, the mature GC reveal a stereotypic bipolar morphology with apical dendrites and an basal axon forming the mossy fiber tracts mainly in the hilar region [18].

Using retroviral labeling, we detected a significant number of new GC with atypical morphology and dendritic branching following ischemia. In particular, we observed GC displaying an additional dendritic tree extending from the basal pole towards the hilus (Fig 5) which is considered an immature feature of GC (MCAO-ST,  $n = 5/162$  (3,09%), MCAO-RU,  $n = 8/91$  (8,79%) Interestingly, running increased the number of neurons with aberrant dendritic branching post-stroke (Fig 5) and we additionally observed singular ectopic granule cells in MCAO-RU. In the controls, Sham-ST and Sham-RU, we found only two cells with atypical morphology ( $n = 2/178$  (1,12%). Taken together, ischemia increases the number of new born neurons but promotes aberrant dendritic branching indicating maladaptive plasticity in the DG.

Finally, we analyzed whether the aberrant neurons express spines as postsynaptic structures indicating network integration. Mushroom-shaped spines are considered mature whilst thin spines as immature. Quantification of spines by confocal microscopy revealed an almost similar number of mushroom spines on aberrant and regular granule cells (Fig 5D1). The ratio of mushroom and thin spines was similar in both granule cell types (Fig 5D2). In summary, the expression of mature mushroom spines by aberrant cells suggest that they are synaptically integrated and can influence the hippocampal network.

## Discussion

Stroke significantly stimulates neurogenesis in the adult dentate gyrus, although the functional role of this postlesional response is mostly unclear. Notably, higher numbers of new neurons



**Fig 5. Stroke induces aberrant neurogenesis.** **A**, Morphology of regular (“non-aberrant”) GFP-positive neurons after retroviral tracing in sham operated control. **B1-4**, Distinct examples of aberrant neurons following stroke expressing additional basal dendrites toward the hilus (bipolar cells). **C1**, Regular granule cell with characteristic dendritic tree spanning the granule cell layer. Right panel: higher magnification of one dendrite with spines. **C2**, Aberrant granule cell extending dendrites towards hilus. Right panel: higher

magnification of one dendrite with spines. **D1-D2**. Quantification of spines in aberrant and regular granule cells (D1, total number of spines. D2, percentage of mushroom spines). Scale bars: 10 $\mu$ m (C1, C2 left) and 5 $\mu$ m (C1, C2 right).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183463.g005>

do not reliably correlate with better outcome poststroke [9]. Recent findings even suggest that a significant portion of new neurons become aberrantly integrated [10]. Here, we asked the question whether stroke in fact increases the number of new granule cells but thereby also promotes aberrant neurogenesis which subsequently impairs specific learning capabilities that involve newly generated granule cells in the hippocampus.

Using a modified version of the Morris water maze [13] and distinct labeling methods of new neurons, we demonstrate that following middle cerebral artery occlusion, mice revealed a significant impairment relating to the hippocampus-dependent memory tasks. Further, a detailed morphological analysis yielded aberrant neurogenesis in the DG after stroke. Thereby, the total number of newborn neurons increased following MCAO.

In the physiological state, newborn GC in the adult DG undergo a multi-stage maturation process before becoming fully integrated in the pre-existing neuronal circuitry. The neurite outgrowth follows an orderly spatiotemporal pattern. The immature neurons initially send out many short processes. One process from the basal cell pole elongates more rapidly to become the axon. The emergence of this axon extending to the CA3 region within 7–10 days coincides with the appearance of apical dendrites [18]. Basal dendrites are also formed a few days earlier but are merely a development feature of GC and are mostly retracted at day 7. After a period of maximal neurite and spine growth as well as enhanced synaptic plasticity, the new GC form relatively stable synaptic connections within four to six weeks. This process is strictly regulated and < 1% of new neurons reveal aberrant connections in the intact brain [4]. Different brain insults can significantly change the differentiation and integration of GC in the DG. In the rodent model of temporal lobe epilepsy, about 10% of GC display persistent hilar basal dendrites [4] forming aberrant circuitries which contribute to hyperexcitability in the hippocampus [19,20]. Besides aberrant dendritic branching, ectopic GC in the hilus can also be observed in the epileptic brain indicating an ectopic migration of some neurons [4]. Importantly, in epilepsy models, aberrant new neurons were regularly associated with a general increase of neurogenesis in DG [21,22].

In the ischemic brain, we previously demonstrated that increased neurogenesis was associated with aberrant dendritic connections and ectopic location of new GC in rats [10] although the functional impact of this observation remained unclear. In the present study, we now prove that aberrant neurogenesis also occurs in the murine hippocampus and is associated with poorer performance in hippocampal-dependent memory tasks following focal infarcts.

The number of viral-labelled aberrant neurons in our study is low which might question their functional impact and possibly limit the significance of our findings. Our approach of using a single stereotactic injection of retroviruses into the intrahippocampus allows labelling of only a small fraction of the cells. This is because, in order to be labelled, transfected cells need to be close to the injection site and be in a process of cell division. And because aberrant integration occurs in only 10–20% of newly born neurons in the lesioned brain, the probability of labeling an aberrant neuron is further reduced.

In epilepsy models in which neurogenesis is generally more enhanced in comparison to models using ischemic infarcts, viral labeling of newly generated cells has also been performed. In these models, the extent of aberrant neurogenesis was also low but had a significant impact on network function [23,24]. Myers et al. recently demonstrated that even a small population of aberrant granule cells (about 5%) caused a significant impairment of spatial memory by changing the

backprojections from the CA3 region [25]. In summary, these studies conclusively indicate that even a low number of aberrant neurons severely affects hippocampal function.

The analysis of the functional impact of adult neurogenesis in behavioral experiments or cognitive tasks remains challenging. The water maze still represents the gold standard for testing hippocampal function in rodents. However, the application of standard protocol and the analysis of basic parameters of the MWM yielded conflicting data related to adult neurogenesis in the DG.

The newly generated neurons do not appear to be beneficial for hippocampal function *per se*, but rather contribute to highly specific functional aspects of spatial learning that become apparent only when certain task demands are encountered or when the spatial memory is stressed [13]. The new neurons particularly improve the ability to separate distinct complex visual contexts [5,26] and allow rapid adaptation to a new context. Here we employed a modified version of the MWM comprising complex visual landmarks and goal reversal at day 4, which challenges the hippocampal function. We additionally used read out parameters that are more specifically related to the functional contribution of adult neurogenesis [11]. Rapid adaptation is particularly challenged after the platform position is changed on days 4 and 5 in MWM. We observed the major difference of latencies at day 5 and a complete lack of the precise search strategy “direct swim” in MCAO-ST in comparison to Sham-ST.

Running which is considered as a classic neurogenic stimulus, further increased the number of newly generated neurons but also enhanced aberrant neurogenesis poststroke. By increasing neurogenesis in the hippocampus, running apparently also raises the probability of aberrant integration and does not successfully counteract maladaptive hippocampal plasticity in the ischemic brain. The analysis of the latencies in MWM consistently revealed a significant difference between MCAO and Sham in both running groups, particularly after goal reversal (Fig 2B). However, comparing the strategies, the MCAO-RU animals used a similar level of spatial navigation (Fig 4B) as Sham-RU, particularly on days 1–3, indicating at least a modest benefit from the increased hippocampal neurogenesis.

Although running is associated with more new neurons in the hippocampus, we observed no significant improvement in MWM (comparing Sham-RU vs Sham-ST) in the sham operated groups. This finding can be explained by the fact that adult neurogenesis only becomes involved in spatial memory when the information processing capacity in the DG is sufficiently stressed [13] e.g. poststroke. Under more “physiological conditions” the sensitivity of our MWM might be not high enough to show minor differences between runners and non-runners in the sham operated groups with sample sizes of 7–8 animals per group.

Finally, stroke also induced differences in MWM strategies that are considered hippocampal independent (Fig 3) pointing to a stroke-induced broader disruption of hippocampal circuitry which goes beyond the effect of aberrant neurogenesis.

Although clinical observations indicate that stroke survivors frequently develop mild to moderate cognitive deficits [2,27] related to the hippocampus, the etiology of this phenomenon is not yet understood. Our data provide a possible clue to the cellular mechanisms that might contribute to memory impairment poststroke.

## Conclusions

Taken together our results demonstrate that ischemic insults cause hippocampal-dependent memory deficits which are associated with aberrant neurogenesis in the dentate gyrus indicating an ischemia-induced maladaptive plasticity in remote brain areas. More studies are needed to clarify whether tailored rehabilitative and therapeutic approaches might counteract aberrant neurogenesis and improve hippocampal-dependent memory performance.

## Supporting information

**S1 Fig. Illustration of experimental design and stroke-induced lesion.** **A**, Adult mice were allocated to four experimental groups: MCAO or Sham operation with standard housing or free access to running wheels, respectively. Proliferation marker EdU was injected for 2 weeks starting 3 days postsurgery. GFP-retrovirus was injected 4 days after surgery. Spatial learning was assessed in the Morris water maze (MWM) at days 42 to 46. **B**, Representative images of coronal brain slices, control and MCAO, red frame indicates ischemic insult of the left hemisphere.

(PDF)

**S1 Data. Supporting information.** Data of cell counts, behavioural experiments and analysis of neuron morphology.

(XLSX)

## Acknowledgments

We thank Julia Karius for excellent technical assistance, and Nasim Kroegel for editing the manuscript.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Otto W. Witte, Christoph Redecker, Albrecht Kunze, Silke Keiner.

**Data curation:** Florus Voitke, Mihai Ceanga, Max Rudolph, Albrecht Kunze.

**Formal analysis:** Florus Voitke, Max Rudolph, Albrecht Kunze.

**Funding acquisition:** Christoph Redecker.

**Investigation:** Florus Voitke, Mihai Ceanga, Fanny Niv.

**Methodology:** Mihai Ceanga, Fanny Niv.

**Project administration:** Otto W. Witte, Christoph Redecker, Silke Keiner.

**Resources:** Otto W. Witte.

**Supervision:** Otto W. Witte, Albrecht Kunze, Silke Keiner.

**Validation:** Otto W. Witte, Albrecht Kunze.

**Visualization:** Albrecht Kunze, Silke Keiner.

**Writing – original draft:** Florus Voitke, Albrecht Kunze.

**Writing – review & editing:** Otto W. Witte, Christoph Redecker, Albrecht Kunze, Silke Keiner.

## References

1. Vermeer SE, Prins ND, den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, et al. (2003) Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N Engl J Med* 348: 1215–1222. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022066> PMID: 12660385
2. Prins ND, van Dijk EJ, den Heijer T, Vermeer SE, Jolles J, et al. (2005) Cerebral small-vessel disease and decline in information processing speed, executive function and memory. *Brain* 128: 2034–2041. <https://doi.org/10.1093/brain/awh553> PMID: 15947059
3. Blum S, Luchsinger JA, Manly JJ, Schupf N, Stern Y, et al. (2012) Memory after silent stroke: hippocampus and infarcts both matter. *Neurology* 78: 38–46. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31823ed0cc> PMID: 22201111

4. Shapiro LA, Ribak CE, Jessberger S (2008) Structural changes for adult-born dentate granule cells after status epilepticus. *Epilepsia* 49 Suppl 5: 13–18.
5. Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, et al. (2011) Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472: 466–470. <https://doi.org/10.1038/nature09817> PMID: 21460835
6. Rangel LM, Alexander AS, Aimone JB, Wiles J, Gage FH, et al. (2014) Temporally selective contextual encoding in the dentate gyrus of the hippocampus. *Nat Commun* 5: 3181. <https://doi.org/10.1038/ncomms4181> PMID: 24518986
7. Dupret D, Fabre A, Dobrossy MD, Panatier A, Rodriguez JJ, et al. (2007) Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol* 5: e214. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050214> PMID: 17683201
8. Yu TS, Washington PM, Kernie SG (2016) Injury-Induced Neurogenesis: Mechanisms and Relevance. *Neuroscientist* 22: 61–71. <https://doi.org/10.1177/1073858414563616> PMID: 25520428
9. Geibig CS, Keiner S, Redecker C (2012) Functional recruitment of newborn hippocampal neurons after experimental stroke. *Neurobiol Dis* 46: 431–439. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.02.007> PMID: 22366183
10. Niv F, Keiner S, Krishna, Witte OW, Lie DC, et al. (2012) Aberrant neurogenesis after stroke: a retroviral cell labeling study. *Stroke* 43: 2468–2475. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.660977> PMID: 22738919
11. Garthe A, Behr J, Kempermann G (2009) Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One* 4: e5464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005464> PMID: 19421325
12. Kempermann G (2012) New neurons for 'survival of the fittest'. *Nat Rev Neurosci* 13: 727–736. <https://doi.org/10.1038/nrn3319> PMID: 22948073
13. Garthe A, Kempermann G (2013) An old test for new neurons: refining the Morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci* 7: 63. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00063> PMID: 23653589
14. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 8: e1000412. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412> PMID: 20613859
15. Kunze A, Congreso MR, Hartmann C, Wallraff-Beck A, Huttmann K, et al. (2009) Connexin expression by radial glia-like cells is required for neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 11336–11341. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813160106> PMID: 19549869
16. Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL (2000) Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci* 20: 6144–6158. PMID: 10934264
17. Cho KO, Lybrand ZR, Ito N, Brulet R, Tafacory F, et al. (2015) Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. *Nat Commun* 6: 6606. <https://doi.org/10.1038/ncomms7606> PMID: 25808087
18. Shapiro LA, Ribak CE (2005) Integration of newly born dentate granule cells into adult brains: hypotheses based on normal and epileptic rodents. *Brain Res Brain Res Rev* 48: 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.08.003> PMID: 15708627
19. Patel LS, Wenzel HJ, Schwartzkroin PA (2004) Physiological and morphological characterization of dentate granule cells in the p35 knock-out mouse hippocampus: evidence for an epileptic circuit. *J Neurosci* 24: 9005–9014. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2943-04.2004> PMID: 15483119
20. Austin JE, Buckmaster PS (2004) Recurrent excitation of granule cells with basal dendrites and low interneuron density and inhibitory postsynaptic current frequency in the dentate gyrus of macaque monkeys. *J Comp Neurol* 476: 205–218. <https://doi.org/10.1002/cne.20182> PMID: 15269966
21. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, et al. (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17: 3727–3738. PMID: 9133393
22. Jessberger S, Zhao C, Toni N, Clemenson GD Jr., Li Y, et al. (2007) Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling. *J Neurosci* 27: 9400–9407. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2002-07.2007> PMID: 17728453
23. Scharfman H, Goodman J, McCloskey D (2007) Ectopic granule cells of the rat dentate gyrus. *Dev Neurosci* 29: 14–27. <https://doi.org/10.1159/000096208> PMID: 17148946
24. Jessberger S, Parent JM (2015) Epilepsy and Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.

25. Myers CE, Bermudez-Hernandez K, Scharfman HE (2013) The influence of ectopic migration of granule cells into the hilus on dentate gyrus-CA3 function. *PLoS One* 8: e68208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068208> PMID: 23840835
26. Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD Jr., Fragniere A, et al. (2009) A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325: 210–213. <https://doi.org/10.1126/science.1173215> PMID: 19590004
27. Brainin M, Tuomilehto J, Heiss WD, Bornstein NM, Bath PM, et al. (2015) Post-stroke cognitive decline: an update and perspectives for clinical research. *Eur J Neurol* 22: 229–238, e213-226. <https://doi.org/10.1111/ene.12626> PMID: 25492161

## 7 Diskussion

Die vorliegende Studie konnte nachweisen, dass sowohl der Schlaganfall als auch das Laufradtraining die Neurogenese signifikant steigern. Eine Verknüpfung dieser beiden Faktoren wurde bisher nicht ausreichend untersucht und war Hauptfokus der vorliegenden Doktorarbeit. Es konnte gezeigt werden, dass ein zusätzliches Laufradtraining nach einem ischämischen Schlaganfall die Neurogenese weiter steigert. Ein signifikanter Unterschied zu Tieren mit Laufradtraining ohne Ischämie zeigte sich nicht. Dabei konnte die Studie erstmals aberrante Neuronen nach Schlaganfall bei Mäusen nachweisen, deren Anzahl durch die Verknüpfung von Ischämie und Laufradtraining erhöht wurde.

Mit Hilfe von intrahippocampalen Injektionen retroviraler Vektoren konnte neben der morphologischen Untersuchung der regulären und aberranten Neuronen auch eine Charakterisierung der Dornfortsätze durchgeführt werden. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den regulär- und aberrant integrierten Neuronen. Die Ausbildung synaptischer Verbindungen deutet auf eine Integration der Neuronen in das bestehende Netzwerk hin.

Zusätzlich wies die post-ischämisch gesteigerte Neurogenese in der modifizierten Version des MWM, mit einem Plattformwechsel an Tag vier, eine Verschlechterung des räumlichen Gedächtnisses auf. Dabei zeigten sich Verschlechterungen im Erlernen des Tests und im Umlernen nach Plattformwechsel.

Die Studie konnte klar nachweisen, dass die Kombination aus Schlaganfall und motorischem Training in Form von Laufradtraining zwar die Neurogenese signifikant steigert, aber zu einem höheren Anteil integrierter aberranter Neuronen führt. Dabei ist anzunehmen, dass diese aberranten Neuronen die kognitive Leistung im MWM beeinflussen.

### 7.1 Adulte Neurogenese nach Laufradhaltung

Die adulte Neurogenese kann durch zahlreiche endogene und exogene Faktoren beeinflusst werden (Vadodaria und Gage 2014, Toda und Gage 2018). In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der körperlichen Aktivität auf die Neurogenese in Form von Laufradhaltung untersucht und eine Verdoppelung der Anzahl neuer Neuronen festgestellt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Literatur und wurde erstmals 1999 durch die Arbeitsgruppe von van Praag gezeigt (van Praag et al. 1999a). Seitdem konnte dieser Einfluss in der beschriebenen Größenordnung in weiteren

Studien konsistent repliziert werden und eine detaillierte Betrachtung zeigte einen massiven Proliferationsanstieg der neuronalen Vorläuferzellen innerhalb der ersten zwei Wochen (van Praag et al. 1999a, Eadie et al. 2005, Kempermann et al. 2010, Vivar et al. 2013, Vadodaria und Gage 2014). Dabei kommt es insbesondere zu einer vermehrten Teilung der Typ-2-Progenitorzellen (Kronenberg et al. 2003, Steiner et al. 2008). Im Gegensatz dazu steht die dauerhafte motorische Aktivierung, die langfristig zu einer Abnahme der Proliferation führt, aber das Überleben der Neuronen während der Ausreifung verbessert (Kronenberg et al. 2006, Snyder et al. 2009a). Die Teilungsrate der Vorläuferzellen fällt nach zwei Wochen wieder auf das Ausgangsniveau ab (Kronenberg et al. 2006). Die Studien zeigen somit, dass Laufradtraining in den ersten zwei Wochen die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen steigert und ein langanhaltendes Laufradtraining das Überleben der neu entstandenen Neuronen verbessert (Kronenberg et al. 2006, Kempermann 2011). Angewendet auf die vorliegende Studie, mit einer Laufradnutzung über sieben Wochen, kann postuliert werden, dass in den ersten zwei Wochen die neuronalen Vorläuferzellen zur Proliferation angeregt wurden und im Weiteren das Überleben der neugebildeten Neuronen verbessert wurde. Außerdem entspricht die gemessene Steigerungsrate der Neurogenese den konsistenten Daten der Literatur und zeigt damit eine erfolgreiche Anwendung der Methode der Laufradhaltung (van Praag et al. 1999a).

## 7.2 Adulte Neurogenese nach Schlaganfall

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Neurogenese ist der Schlaganfall. Die Neubildung der Nervenzellen stellt dabei eine weitere Form der zerebralen Plastizität dar, welche als Regenerationsfähigkeit nach der Hirnschädigung interpretiert wurde. Bisher konnte deren physiologische Rolle aber noch nicht aufgeklärt werden. Zahlreiche Studien konnten bereits nachweisen, dass sowohl die Proliferation, Migration und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen sowie das Überleben und die Integration neuer Nervenzellen signifikant durch die Induktion eines Schlaganfalls beeinflusst werden (Yagita et al. 2001, Arvidsson et al. 2001, Jin et al. 2001, Zhang et al. 2004, Niv et al. 2012). Bei der Betrachtung der Literatur sind die genutzten Infarktmodelle, das Injektionsschema der Proliferationsmarker und die Überlebenszeiträume der Tiere zu beachten. In der vorliegenden Studie führte dies zu einer Steigerung der Neurogenese von circa 60 % gegenüber den Kontrolltieren sieben Wochen nach dem Schlaganfall. Dabei wurden sich teilende Zellen von Tag 3 bis Tag 14 postischämisch

markiert. Diese Steigerungsrate von 60 % steht im Einklang mit bereits publizierten Daten mit ähnlichem Untersuchungsaufbau. Diese vergleichbaren Studien zeigen eine Steigerungsrate der Neurogenese von 40 % durch kleine kortikale Infarkte gegenüber einer Kontrollgruppe (Kluska et al. 2005, Walter et al. 2010). Auch nach einer Injektion von Proliferationsmarkern lediglich am sieben Tag nach der Infarktinduktion, konnte weitere vier Wochen danach eine Steigerung von 50 % nachgewiesen werden (Takasawa et al. 2002). Nach einer Zellmarkierung an Tag zwei bis sechs postischämisch konnte vier Wochen nach dem Infarkt ebenfalls eine Erhöhung der Neurogenese von 50 % festgestellt werden (Sun et al. 2019). Dabei spiegeln die Überlebenszeiträume der Tiere nach Applikation der Proliferationsmarker wichtige Stadien der adulten Neurogenese wider, wie beispielsweise Proliferation, Differenzierung, Überleben und Integration der neuentstandenen Neuronen (Kempermann 2011, Vadodaria und Gage 2014, Toda und Gage 2018). Nach Induktion eines Schlaganfalls kommt es innerhalb von zwei Wochen nach dem Ereignis zu einem massiven Anstieg der Proliferation der verschiedenen Vorläuferzellen (Yagita et al. 2001, Liu et al. 1998, Arvidsson et al. 2001, Jin et al. 2001). So konnte elf Tage nach dem Infarkt sogar eine Erhöhung der Teilungsrate auf das Zwölfwache gegenüber Kontrolltieren festgestellt werden (Liu et al. 1998). Die Proliferationsrate steigt dabei wenige Tage nach dem Infarkt erstmalig an und nach dem Maximum zu Beginn der zweiten Woche kommt es wieder zu einem Abfall auf das Kontrollniveau (Liu et al. 1998, Yagita et al. 2001, Arvidsson et al. 2001). So konnte im infarzierten Gehirn bereits acht Stunden postischämisch eine messbare vermehrte Teilung der endogenen Stammzellen festgestellt werden, auf die die Vorläuferpopulationen innerhalb von drei Tagen folgen, wobei insbesondere die Typ-2-Zellen reagieren (Kunze et al. 2006, Walter et al. 2010, Keiner et al. 2010). Der schnelle Abfall dieser Teilungsrate konnte in zahlreichen Studien zwei Wochen nach dem Schlaganfall nachgewiesen werden, da die Teilungsrate im Gyrus dentatus zu diesem Zeitpunkt wieder der der Kontrolltiere entsprach (Liu et al. 1998, Jin et al. 2001, Yagita et al. 2001, Arvidsson et al. 2001). Luo und Kollegen konnten hingegen sogar eine Reduktion der Neurogenese zwei Wochen postischämisch nachweisen (Luo et al. 2007).

Trotz dieser signifikanten Steigerung der Teilungsrate konnte, wie zuvor beschrieben, nach Ausreifung der Neuronen ab vier Wochen postischämisch nur eine Steigerung der Neurogenese um 50 % gegenüber den Kontrolltiere nachgewiesen werden

(Takasawa et al. 2002, Kluska et al. 2005, Walter et al. 2010, Sun et al. 2019) Dies liegt in der fehlende Stimulation der Überlebensrate ausreifender Neuronen nach Schlaganfall begründet (Takasawa et al. 2002, Vadodaria und Gage 2014). Vielmehr kommt es zum Absterben eines Großteils der vermehrt neugebildeten Zellen durch Apoptose und die Überlebensrate der proliferierten Zellen ist nach dem Schlaganfall deutlich geringer als bei Kontrolltieren (Takasawa et al. 2002, Tureyen et al. 2004). Einige, der im Rahmen des Hirninfarkts gebildeten Zellen, überleben dennoch, da diese auch sieben Monate nach der Schlaganfallinduktion nachgewiesen werden können (Sharp et al. 2002, Takasawa et al. 2002).

In der vorliegenden Studie wurde der Proliferationsmarker 3 bis 14 Tage postischämisch appliziert. Dieses gewählte Zeitfenster begünstigte somit die Markierung stark proliferierender Vorläuferzellen nach dem Schlaganfall. Der Zeitraum der Gewebefixierung sieben Wochen nach dem Infarkt untersucht die nach der Proliferationssteigerung überlebenden ausgereiften Zellen. Die dabei gemessene Neurogenesesteigerung fügt sich gut in die bestehende Literatur ein.

### 7.3 Postischämische adulte Neurogenese mit zusätzlichem Laufradtraining

Die vorliegende Studie untersuchte die Auswirkungen motorischer Aktivität in Form von Laufradtraining auf die postischämische adulte Neurogenese. Diesbezüglich bewirkte ein siebenwöchiges Laufradtraining nach dem Schlaganfall gegenüber Tieren mit Hirninfarkt ohne Laufradtraining eine signifikante Steigerung der Neurogenese von circa 50 %. Eine signifikante Steigerung bei Tieren mit Schlaganfall und Laufradtraining gegenüber Tieren mit Scheinoperation und Laufradtraining trat jedoch nicht auf.

In Tierexperimenten wird körperliche Aktivität durch Laufradhaltung als Modell der Rehabilitation nach Schlaganfällen schon seit circa 40 Jahren verwendet (Stummer et al. 1994, Stummer et al. 1995). Nachdem Hirnischämie und körperliche Aktivität als Einflussfaktoren der Neurogenese detektiert wurden, erfolgte die Untersuchung der Neubildung von Neuronen nach der Verknüpfung beider Stimuli (Luo et al. 2007, Zhao et al. 2009, Geibig et al. 2012, Ahn et al. 2016, Sun et al. 2019). Im Vergleich dieser Studien mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit muss die Variabilität der verschiedenen relevanten Parameter betrachtet werden. Dabei handelt es sich um Beginn und Dauer des Laufradtrainings, freiwilliges oder erzwungenes Laufradtraining,

Art des Schlaganfallmodells, Alter und Art der verwendeten Spezies sowie die Markierungsmethoden zur Analyse der Neurogenese. Insbesondere fällt bei der Betrachtung der uns bekannten Literatur das Fehlen einer Untergruppe mit Scheinoperation und Lauftraining auf. Daher konnte die fehlende signifikante Steigerung der Neurogenese durch Schlaganfall und Laufradtraining gegenüber Tieren mit Laufradtraining ohne Hirnischämie erstmalig in der vorliegenden Studie gezeigt werden. Diese erste Evidenz könnte darauf hindeuten, dass Laufradtraining per se einen großen Stimulator der Neurogenese darstellt und diese infarktabhängig nicht weiter gesteigert werden kann.

Im Gegensatz dazu wurde die weitere Steigerung der postischämischen Neurogenese durch Laufradtraining gegenüber Tieren mit Schlaganfall ohne zusätzliche körperliche Aktivität schon mehrfach nachgewiesen. Durch Sun und Kollegen wurde bei einem ähnlichem Versuchsaufbau durch Laufradtraining ebenfalls eine Steigerung der postischämischen Neurogenese um circa 50 % erzielt (Sun et al. 2019). Auch bei der Anwendung von forciertem Laufradtraining konnte diese Steigerungsrate bestimmt werden (Zhao et al. 2009). Die Arbeitsgruppe von Luo und Kollegen konnte sogar einen Anstieg um 200 % nachweisen (Luo et al. 2007). Ein wesentlicher Unterschied bei Luo und Kollegen zu der vorliegenden Arbeit ist der Zeitpunkt der Applikation des Proliferationsmarkers. Diese erfolgte bei Luo und Kollegen in der dritten Woche nach der Ischämieinduktion. Auf Grundlage der Literatur ist davon auszugehen, dass die schlaganfallinduzierte Proliferationssteigerung zu diesem Zeitpunkt bereits wieder auf das Ausgangsniveau abgefallen war (Jin et al. 2001, Arvidsson et al. 2001). Die von Luo und Kollegen gemessene Steigerung von 200 % beschreibt daher wahrscheinlich einen Einfluss der körperlichen Aktivität auf die Neurogenese bereits nach Ablauf der ischämisch induzierten Proliferationssteigerung. Die vorliegende Studie hingegen erfasst aufgrund des gewählten Messzeitraums der Proliferation an Tag 3 bis 14 nach Schlaganfallinduktion explizit den Einfluss auf die ischämisch induzierte Neurogenese. Dieser unterschiedliche Versuchsaufbau könnte die abweichenden Werte bezüglich der durch postischämisches Laufradtraining bedingten weiteren Neurogenesesteigerung erklären. In einer Studie von Geibig und Kollegen wurde eine Steigerungsrate der Neurogenese von 100 % durch postischämisches Laufradtraining gegenüber Tieren mit Schlagfall in Standardhaltung gemessen (Geibig et al. 2012). Dabei wurden kleine kortikale photothrombotische Infarkte verwendet, welche zu einem geringen Proliferationsanstieg führen. Die geringere Neurogenesesteigerung

durch den kleinen Infarkt könnte die größere Steigerungsrate durch postischämisches Laufradtraining bei Geibig und Kollegen gegenüber der vorliegenden Studie womöglich erklären.

Betrachtet man die Ergebnisse aus der vorliegenden Studie in Zusammenschau mit der Literatur, ist von einer weiteren Steigerung der Neurogenese durch postischämisches Laufradtraining gegenüber Tieren mit Schlaganfall ohne Laufradtraining auszugehen. Dieser weitere Anstieg beträgt in Abhängigkeit von der Größe der Infarkte zwischen 50 % und 100 %. Erstmals konnte gezeigt werden, dass die Neurogenesesteigerung nach Schlaganfall und Laufradtraining nicht gegenüber der alleinigen Steigerung durch Laufradtraining, bei Tieren ohne Schlaganfall, erhöht ist.

#### 7.4 Morphologie adult gebildeter Neuronen nach Schlaganfall und Laufradtraining

Neben der Steigerung der Neurogenese ist die Integration der neu gebildeten Neuronen für deren Einfluss auf das bestehende hippocampale Netzwerk von entscheidender Bedeutung. Die morphologische Untersuchung der neu gebildeten Neuronen gelang erstmals von Praag und Kollegen durch Transfektion sich teilender Zellen mit einem GFP-gekoppelten Retrovirus (van Praag et al. 2002). Niv und Kollegen wendeten diese Methode bei Tieren mit Schlaganfällen an und konnten bei einem signifikanten Teil der Zellen eine vom physiologischen Zustand abweichende aberrante Morphologie nachweisen (Niv et al. 2012). Diese aberranten Zellen zeigten einen zusätzlichen basalen Dendriten oder eine Migration in den Hilus. Der Reifungsprozess der ABN ist durch verschiedene biochemische Faktoren reguliert (Toda und Gage 2018). Im Rahmen dieser Entwicklung bilden die reifenden Neuronen für einen gewissen Zeitraum einen basalen Dendriten aus (Rao und Shetty 2004). Dieser basale Dendrit, welcher ein typisches Merkmal aberranter Zellen ist, bildet sich aber im Verlauf des Reifungsprozesses wieder zurück. So entstehen nach vier bis sechs Wochen schließlich Zellen mit stabilen synaptischen Verbindungen, wobei der Anteil aberranter Neuronen mit einem weiterhin bestehenden basalen Dendriten oder einer Lokalisation im Hilus physiologisch unter einem Prozent beträgt (Shapiro et al. 2008).

In der Betrachtung der Daten der morphologischen Auswertung der ABN in der vorliegenden Studie erfüllten nach Schlaganfall und Standardhaltung 3,1 % der Zellen

die Kriterien für eine Aberration und bei Schlaganfall mit zusätzlicher Laufradhaltung 8,9 % der Neuronen. Bei den Kontrolltieren ohne Schlaganfälle wurden diese Zellen nur zu 1,4 % bei Standardhaltung und zu 0 % bei Laufradhaltung detektiert. Nach Schlaganfall mit Laufradexposition war der Unterschied zu Tieren mit Laufradhaltung und Scheinoperation signifikant. Bei den Tieren mit Schlaganfall unter Standardhaltung gegenüber Tieren mit Standardhaltung ohne Hirnischämie hingegen zeigt sich dieser Unterschied nicht.

Zur Einordnung der Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen sich bisher zwei Studien mit morphologischen Untersuchungen der ABN nach Schlaganfall heranziehen (Niv et al. 2012, Cuartero et al. 2019). Die Analyse durch Cuartero und Kollegen zeigte dabei bei Mäusen nach Schlagfallinduktion und Virusinjektion keinerlei aberrante Neuronen. Dieses Ergebnis lässt sich am ehesten durch den unterschiedlichen Untersuchungszeitraum bei Cuartero und Kollegen und der vorliegenden Studie erklären. Bei Cuartero und Kollegen erfolgte die Injektion des Virus erst zwei Wochen nach Infarktinduktion. Wie bereits dargestellt, wird davon ausgegangen, dass zu diesem Zeitpunkt die postischämische Proliferationssteigerung im Hippocampus bereits wieder auf das Ausgangsniveau abgefallen ist (Arvidsson et al. 2001, Jin et al. 2001, Yagita et al. 2001). Daher könnte auch die Entstehung aberranter Zellen zwei Wochen nach dem Schlaganfall wieder dem Kontrollniveau entsprechen und die unterschiedlichen Ergebnisse widersprechen sich aufgrund der verschiedenen Injektionszeitpunkte nicht. Die Studie von Niv und Kollegen konnte bei Ratten nach MCAO eine Rate aberranter Neuronen von etwa 10 % und nach kleinen photothrombotischen Infarkten von etwa 5 % nachweisen (Niv et al. 2012). Diese deutlichen Unterschiede bei Tieren mit Standardhaltung und Infarktinduktion durch MCAO von 10 % bei Niv und Kollegen, gegenüber 3 % in der vorliegenden Arbeit, ist auffällig. Bei gleichem Injektionszeitpunkt der beiden Studien, vier Tage nach der Hirnischämie, könnte der kürzere Überlebenszeitraum und die Verwendung von Ratten bei Niv und Kollegen ein Erklärungsansatz sein.

So zeigt sich dieser Unterschied zwischen Mäusen und Ratten auch in einer anderen pathologischen Stimulation der aberranten Neurogenese. Nach Epilepsie ist die aberrante Neurogenese umfangreicher untersucht und es konnten besonders hohe Raten an aberranten Neuronen von bis zu 34 % bei Ratten detektiert werden. (Patel et al. 2004, Austin und Buckmaster 2004, Jessberger et al. 2007b, Shapiro et al. 2008). Auch in den Epilepsiestudien war das Auftreten von aberranten Zellen mit einer

Erhöhung der Neurogenese vergesellschaftet (Parent et al. 1997, Jessberger et al. 2007a, Jessberger et al. 2007b). Die Grundlage dieser epilepsieinduzierten Neurogenesesteigerung ist, analog zur Stimulation durch den Schlaganfall, ein starker Anstieg der Proliferation der Vorläuferzellen (Parent et al. 1997, Jessberger et al. 2005, Lugert et al. 2010) In den Epilepsiestudien wurde größtenteils mit Ratten experimentiert. In den wenigen Untersuchungen mit Mäusen zeigt sich eine geringere Anzahl aberranter Neuronen als bei den Experimenten mit Ratten (Hester und Danzer 2013, Beamer et al. 2018). Diese in Epilepsiestudien gemessene reduzierte Menge aberranter Neuronen bei Mäusen gegenüber Ratten könnte die ebenfalls reduzierte Anzahl in der vorliegenden Studie mit Mäusen gegenüber der von Niv und Kollegen mit Ratten erklären.

Eine Einordnung des deutlich erhöhten Anteils von aberranten Neuronen nach postischämischem Laufradtraining ist bisher nicht möglich. Sowohl bei Studien mit Schlaganfall und Laufradhaltung als auch bei Studien mit Epilepsie und Laufradhaltung wurden noch keine morphologischen Analysen der ABN durchgeführt (Chen et al. 2006, Geibig et al. 2012, Gorantla et al. 2016, Sun et al. 2019).

Spekulativ könnte eine Erklärung des signifikant erhöhten Anteils aberranter Neuronen durch Laufradhaltung nach Schlaganfallinduktion in den zugrundeliegenden biochemischen Faktoren liegen. Eine veränderte Produktion verschiedener Moleküle zur Regulation des Reifungsprozesses konnten bereits in Studien zu aberranten Zellen detektiert werden (Gorter et al. 2014, Mooney et al. 2016, Bielefeld et al. 2019). Auch die Proliferationssteigerung nach Schlaganfall wird mit einer Aktivierung verschiedener Signalwege über Moleküle wie BDNF, Fibroblast growth factor 2 (FGF-2), Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) und mit Wnt in Verbindung gebracht (Wiltrout et al. 2007, Cho et al. 2015, Marlier et al. 2015, Lindvall und Kokaia 2015). Diese Faktoren spielen auch in der Neurogenese bei körperlicher Aktivität eine wichtige Rolle. Hierbei wurden insbesondere BDNF, FGF-2, IGF-1 und Nerve growth factor (NGF) in der Literatur beschrieben (Neeper et al. 1996, Gomez-Pinilla et al. 1997, Trejo et al. 2001, Cotman et al. 2007, Vivar et al. 2013). Eine weitere Stimulation dieser, bereits durch den Schlaganfall aktivierten Signalwege, könnte daher ein Erklärungsansatz für die signifikant erhöhte Entstehung aberranter ABN durch postischämisches Laufradtraining sein. So konnte auch durch eine Fehlregulation im Reifungsprozess, ausgelöst durch Blockierung der Apoptose, eine Steigerung der Neurogenese und eine signifikant vermehrten Entstehung aberranter Zellen induziert werden (Scharfman et

al. 2007, Myers et al. 2013, Jessberger und Parent 2015). Insgesamt weist die vorliegende Studie erstmals eine signifikant vermehrte Bildung aberranter Zellen nach Schlaganfall und Laufradhaltung auf. Es sind hier aber weitere Studien nötig, um die diesem Phänomen zugrundeliegenden Prozesse genauer zu untersuchen.

Bei den Untersuchungen der viral transfizierten Zellen wurden neben der Lokalisation im Hippocampus und dem Dendritenbaum auch der Dornfortsatzbesatz der neugebildeten Neuronen betrachtet. Die vorliegende Studie konnte diesbezüglich keine Unterschiede in der Dichte des Dornfortsatzbesatzes zwischen den regulär gebildeten und aberranten Neuronen nach Schlaganfall nachweisen. Genauere Untersuchungen der synaptischen Ausstülpungen über den Anteil von reifen und unreifen Dornfortsätze ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen aberranten und regulären Neuronen.

Im Vergleich dieser Ergebnisse mit der Literatur konnte bei aberranten Zellen nach epileptischen Anfällen ebenfalls keine signifikante Veränderung oder eine Reduktion der Dichte des Dornfortsatzbesatzes gegenüber regulären Zellen nachgewiesen werden (Jessberger et al. 2007a, Murphy et al. 2011, Beamer et al. 2018). Der Anteil an reifen synaptischen Ausstülpungen zeigte ebenfalls keine signifikante Unterschiede im Vergleich der beiden Zellpopulationen (Jessberger et al. 2007a, Beamer et al. 2018). Diese Studien stützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit einer ähnlichen gemessenen Anzahl an Dornfortsätzen auf einen definierten Abschnitt von 50  $\mu\text{m}$  und einem ähnlichen Anteil an reifen synaptischen Ausstülpungen. In der einzigen uns bekannten Vergleichsstudie zur Betrachtung von Dornfortsätzen bei aberranten Zellen nach Schlaganfall von Niv und Kollegen zeigen sich von der vorliegenden Studie abweichende Ergebnisse. Niv und Kollegen konnten eine signifikant vermehrte Anzahl von Dornfortsätzen und einen signifikant höheren Reifungsgrad nach Schlaganfall gegenüber den Kontrolltieren nachweisen. Dabei wurde von Niv und Kollegen insgesamt eine deutlich geringe Anzahl an Dornfortsätzen mit insgesamt deutlich höherem Reifegrad festgesellt als in der bekannten Literatur. Zusammenfassend ist anhand des Besatzes mit reifen Dornfortsätzen bei aberranten Zellen von einer Integration in das hippocampale Netzwerk auszugehen. Ob und inwieweit sich die Integration der fehlgeformten Zellen und die gesteigerte Neurogenese nach Schlaganfall auf die kognitiven Fähigkeiten der Tiere auswirkt, ist unklar.

## 7.5 Kognitive Fähigkeiten im MWM nach Schlaganfall und Laufradhaltung

Nach wie vor ist bei Experimenten mit Nagern das Morris Water Maze (MWM) eine gängige und gut reproduzierbare Methode zur Untersuchung der Hippocampusfunktion und wird mittlerweile auch virtuell beim Menschen angewandt (Astur et al. 1998, Driscoll et al. 2003). Im derzeitigen Diskurs wird davon ausgegangen, dass die adulte Neurogenese nicht die gesamte Hippocampusfunktion, sondern nur einen speziellen Bereich des hippocampalen Aufgabenspektrums bedient (Kempermann 2012, Toda und Gage 2018). Diese spezielle Funktion kann nur durch spezifische, darauf ausgelegte Untersuchungsbedingungen aufgezeigt werden (Garthe und Kempermann 2013). So wird davon ausgegangen, dass die neu gebildeten Neuronen zur schnellen Anpassung an kleine Veränderungen in einer komplexen Umgebung beitragen (Clelland et al. 2009, Deng et al. 2010, Sahay et al. 2011). Diese Fähigkeit wurde in Verhaltenstests durch Umlernen adressiert (Jessberger et al. 2009, Burghardt et al. 2012). Bei Ablation der Neurogenese konnte in Studien mit mehreren verschiedenen Verhaltenstests nur mit den Neurogenese-spezifischen Verfahren eine signifikante Verschlechterung der Tiere ohne ABN nachgewiesen werden (Zhang et al. 2008, Dupret et al. 2008).

Entsprechend wurde in der vorliegenden Studie eine Neurogenese-spezifische Weiterentwicklung des MWM, mit einer komplexen visuellen Umgebung und einem Wechsel der Plattform (im englischen als „Reversal“ beschrieben) an Tag vier, angewendet (Garthe et al. 2009, Garthe et al. 2014, Garthe et al. 2016). In diesem sogenannten „Reversal-Protokoll“ wird, die von den neu gebildeten Neuronen abhängige schnelle Anpassung, insbesondere beim Umlernen nach dem Wechsel der Plattformposition an Tag vier und fünf, beansprucht. Mit einem Ablationsmodell der Neurogenese konnte so mit dem Reversal-Protokoll ein signifikanter Unterschied detektiert werden, welcher beim klassischen Aufbau des MWM ohne Umlernen nicht feststellbar war (Garthe et al. 2014). Diese Ergebnisse beruhen auf Parametern wie Ziellatenz, Schwimmstrecke und Schwimmgeschwindigkeit und einer Strategiewanalyse. Zur Einteilung des Suchverhaltens in verschiedene Hippocampus-abhängige und Hippocampus-unabhängige Strategien wurden Schwimmpfade der Tiere aufgezeichnet und diese mit einem computerbasierten Algorithmus analysiert (Garthe et al. 2009).

In der vorliegenden Studie konnten mit diesem Reversal-Protokoll durchgehend über alle fünf Untersuchungstage eine schlechtere Leistung der Tiere mit Schlaganfall gegenüber den Kontrolltieren mit Scheinoperation nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Tiere in der Phase des Umlernens nach dem Plattformwechsel an Tag vier und fünf eine noch schlechtere Leistung als in der Phase des Erlernens der ursprünglichen Position an Tag eins bis drei. Dies konnte über eine verlängerte Ziellatenz und eine verlängerte Schwimmstrecke sowie einem geringeren Anteil Hippocampus-abhängiger Strategien bei den Tieren mit Schlaganfall nachgewiesen werden. Nach dem Umlernen konnten die Schlaganfalltiere so die effektivste Hippocampus-abhängige Strategie „*direct swim*“ nicht mehr anwenden, obwohl sie diese zuvor gezeigt hatten. Diese Ergebnisse entsprechen denen der bisher einzigen uns bekannten Studie, welche die kognitiven Auswirkungen des Schlaganfalls mit dem Reversal-Protokoll des MWM untersucht hat. Kathner-Schaffert und Kollegen konnten ebenfalls eine Verschlechterung der Schlaganfalltiere gegenüber den Kontrolltieren über den gesamten Testzeitraum, mit einem besonders starken Unterschied nach Plattformwechsel, zeigen (Kathner-Schaffert et al. 2019). Winter und Kollegen haben bereits 2004 eine andere Variante eines MWM mit Umstellung der Plattform angewendet (Winter et al. 2004). Hierbei mussten die Tiere nach einer Phase des Erlernens der ersten Position über sieben Tage, am achten Tag eine aus dem Wasser herausragende, sichtbare Plattform im gegenüberliegenden Quadranten aufsuchen. Dabei zeigten Tiere mit Schlaganfall ebenfalls eine schlechtere Leistung über den gesamten Testzeitraum, mit einem Maximum nach Plattformwechsel (Winter et al. 2004). Im Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Ablationsstudien zur Etablierung des Reversal-Protokolls zeigen sich hingegen Abweichungen (Garthe et al. 2009, Garthe et al. 2014). Bei den Ablationsstudien fällt nur ein geringes Lerndefizit in den ersten drei Tagen sowie eine deutlich vermehrte Nutzung der Strategie „*Perseverance*“ bei den Tieren mit ablatierter Neurogenese auf (Garthe et al. 2009, Garthe et al. 2014, Garthe et al. 2016). Tiere nach Schlaganfall zeigen in der vorliegenden Arbeit und bei Kathner-Schaffert und Kollegen nur wenig vermehrt die Strategie „*Perseverance*“ (=Beharren) und haben signifikante Defizite über den gesamten Untersuchungszeitraum von fünf Tagen (Kathner-Schaffert et al. 2019). *Perseverance* ist durch ein Aufsuchen der vormaligen Position, statt des neuen Ziels nach Plattformumstellung, gekennzeichnet und gilt als wichtiger Indikator für gestörtes Umlernen (Garthe et al. 2009). Die Ischämie-induzierte Neurogenese führt im MWM

mit Reversal-Protokoll zu deutlichen kognitiven Defiziten, welche sich anders darstellen als Defizite bei einer Abwesenheit neu gebildeter Neuronen. Zur weiteren Einordnung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist eine Betrachtung von Studien mit dem konventionellen Modell des MWM ohne Plattformwechsel nötig. Hier zeigte sich bei Erlernen einer Plattformposition meist über einen Zeitraum von sieben Tagen ebenfalls ein Defizit des räumlichen Denkens bei den Tieren mit Schlaganfall gegenüber Kontrolltieren (Luo et al. 2007, Zhao et al. 2009, Schmidt et al. 2015, Han et al. 2016, Sun et al. 2019). Damit deuten alle Studien zum MWM und Schlaganfall, inklusive der vorliegenden, darauf hin, dass die Tiere nach einer Hirnischämie bei gesteigerter Neurogenese Defizite im räumlichen Lernen aufzeigen, wobei neuere Studien insbesondere ein schlechteres Umlernen nachweisen (Kathner-Schaffert et al. 2019).

In der Betrachtung des Einflusses des Laufradtrainings auf die Leistungen der Tiere im Reversal-Protokoll des MWM in der vorliegenden Studie, konnte sowohl bei den Tieren mit Schlaganfall als auch bei den Tieren mit Scheinoperation keine signifikante Veränderung detektiert werden. Tiere mit Schlaganfall und Laufradtraining zeigten nach dem Umlernen zwar wieder die effektivste Hippocampus-abhängige Strategie „*direct swim*“, aber dies führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Strategien oder der Ziellatenz gegenüber den Tieren mit Schlaganfall unter Standardbedingungen. Der erhöhte Anteil aberranter Neuronen nach postischämischen Laufradtraining führte aber auch zu keiner weiteren Verschlechterung der räumlichen Denkleistung gegenüber den Tieren mit Schlaganfall und Standardhaltung. Eine Einordnung dieser Untersuchung des postischämischen Laufradtrainings mit dem Reversal-Protokoll in die Literatur ist nicht direkt möglich. Anhand der uns bekannten Datenlage ist lediglich ein Vergleich mit Studien möglich, welche bei Tieren mit Laufradhaltung und Schlaganfall ein konventionelles MWM Protokoll ohne Plattformwechsel anwendeten (Luo et al. 2007, Zhao et al. 2009, Sun et al. 2019). Hierbei kam es meist zur Untersuchung der Tiere über sieben Tage, wobei postischämisches Laufradtraining zu einer Verbesserung der Leistung im MWM gegenüber Tieren mit Schlaganfall ohne Laufradtraining führte. Diese Diskrepanz in den Ergebnissen ist möglicherweise auf die fehlende Neurogenesespezifität der konventionellen Protokolle zurückzuführen. So konnte Garthe und Kollegen auch bei gesunden Tieren zeigen, dass mit dem Reversal-Protokoll des MWM durch Laufradhaltung keine Verbesserung gegenüber Tieren unter Standardbedingungen

auftritt (Garthe et al. 2016). Dies steht im Gegensatz zu zahlreichen Untersuchungen mit konventionellen MWM-Protokollen (van Praag et al. 1999a, van Praag et al. 2005, Ang et al. 2006, Garthe et al. 2016). Möglicherweise sind die Verbesserungen durch die Laufradhaltung nicht durch die ABN zu erklären und können daher in dem Reversal-Protokoll nicht detektiert werden. In Schlaganfallstudien am Menschen konnten ebenfalls keine kognitiven Verbesserung nach körperlicher Aktivität nachgewiesen werden (Livingston-Thomas et al. 2016). Die zuvor postulierte positive Rolle der körperlichen Aktivität in der Schlaganfallbehandlung erscheint damit aktuell fragwürdig und es sind weitere Studien zu diesem Thema nötig.

Allgemein ist anzunehmen, dass aufgrund des breiten Schädigungsmusters des Schlaganfalls sensomotorische Defizite die Durchführung der Verhaltenstests beeinflussen können. Sowohl die vorliegende als auch bereits publizierten Studien konnten mit Hilfe von unveränderten Schwimmgeschwindigkeit zwischen Schlaganfalltiere und Kontrollen so körperliche Einflussfaktoren ausschließen (Winter et al. 2004, Schmidt et al. 2015).

Insgesamt konnten die Verhaltenstests mit dem Reversal-Protokoll des MWM nach Schlaganfall, sowohl mit als auch ohne Laufradhaltung, eine Verschlechterung der räumlichen Gedächtnisleistung, insbesondere beim Umlernen, nachweisen. Der Mechanismus dieser kognitiven Beeinträchtigung durch die postischämische Neurogenese und der Anteil des Einflusses von aberranten Neuronen ist noch unklar. In der Epilepsieforschung wurde der Einfluss aberranter Neuronen auf kognitive Fähigkeiten bereits umfangreich untersucht. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Beeinflussung des bestehenden hippocampalen Netzwerks durch die aberranten Neuronen zu kognitiven Verschlechterungen und Epileptogenese führt (Cho et al. 2015, Jessberger und Parent 2015, Bielefeld et al. 2019). Die aberrante Neurogenese konnte dabei mit einer gesteigerten Erregbarkeit des Hippocampus in Verbindung gebracht werden (Patel et al. 2004, Austin und Buckmaster 2004). Bei Tieren mit Schlaganfall konnte ebenso eine Übererregbarkeit heranreifender Neuronen gegenüber Kontrolltieren nachgewiesen werden, sodass auch hier eine negative Beeinflussung des hippocampalen Netzwerks durch die postischämische Neurogenese möglich ist (Ceanga et al. 2019). Ein weiteres Indiz für die aberrante Neurogenese als Ursache von kognitiven Defiziten bei Schlaganfall und Epilepsie ist eine Verbesserung der Tiere durch die Reduktion der Neuronenbildung. So konnte nach epileptischen Anfällen durch die Applikation von antiepileptischen

Medikamenten eine Reduktion der Neurogenese und eine kognitive Verbesserung erzielt werden (Jessberger et al. 2007b). Auch nach der Ablation von neugebildeten Neuronen zeigte sich in Epilepsiemodellen eine Reduktion des kognitiven Defizits (Jung et al. 2004, Cho et al. 2015). Bei Schlaganfallmodellen konnte zuletzt ebenfalls eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten durch eine Ablation der Neurogenese nachgewiesen werden (Cuartero et al. 2019)

## 8 Fazit

Zusammenfassend zeigen die zellulären und behavioralen Ergebnisse eine Beeinflussung der Hippocampusstruktur und -funktion durch den ischämischen Schlaganfall. Eine kognitive Rehabilitation der Tiere, mit einer Verbesserung der räumlichen Lernleistung durch körperliche Aktivität, konnte nicht nachgewiesen werden. Nach Schlaganfall konnte sowohl bei Standardhaltung als auch bei Laufradhaltung eine deutliche Verschlechterung der kognitiven Leistungsfähigkeit bei erhöhter Neurogenese verifiziert werden. Mit der vermehrten Anzahl an neu gebildeten Neuronen geht ein höherer Anteil aberranter Zellen einher, welche in das bestehende Netzwerk integriert werden. Dieser Anteil wird durch ein postischämisches Laufradtraining weiter gesteigert. Diese zusätzliche Steigerung des Anteils aberranter Zellen durch körperliche Aktivität nach Schlagfall führt nicht zu einer weiteren kognitiven Verschlechterung gegenüber Tieren mit Schlaganfall ohne Laufradhaltung. Der Einfluss der aberranten Zellen auf das räumliche Denkvermögen bleibt weiterhin unklar.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich mit klinischen Studien, bezüglich postischämischer kognitiver Defizite, bei Menschen korrelieren (Prins et al. 2005, Rasquin et al. 2005, Blum et al. 2012, Brainin et al. 2015). Bisher sind die zellulären Hintergründe dieser Schlaganfall-induzierten Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten noch völlig unklar. Um die Relevanz der regulären und aberranten Neurogenese beim Menschen aufzuklären, sind weitere Studien nötig. Außerdem gilt es herauszufinden, ob der Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Neurogenese, mit einer verstärkten Bildung aberranter Zellen, nach Schlaganfällen konsistent ist. Im Weiteren stellt sich die Frage, ob auch beim Menschen durch körperliche Aktivität in der Rehabilitation, vermehrt aberrante Neuronen auftreten und zu einer Verschlechterung der kognitiven Leistungen führen. Die vorliegende Studie zeigt erstmalig Korrelationen zwischen aberrant-integrierten Neuronen, kognitiver Verschlechterungen und motorischer Aktivität nach einem Schlaganfall und bietet damit neue Ansatzpunkte zur Aufklärung und Therapie von Schlaganfallpatienten.

## 9 Literaturverzeichnis

- Adlaf EW, Vaden RJ, Niver AJ, Manuel AF, Onyilo VC, Araujo MT, Dieni CV, Vo HT, King GD, Wadiche JI, Overstreet-Wadiche L. 2017. Adult-born neurons modify excitatory synaptic transmission to existing neurons. *Elife*, 6.
- Ahn JH, Choi JH, Park JH, Kim IH, Cho JH, Lee JC, Koo HM, Hwangbo G, Yoo KY, Lee CH, Hwang IK, Cho JH, Choi SY, Kwon YG, Kim YM, Kang IJ, Won MH. 2016. Long-Term Exercise Improves Memory Deficits via Restoration of Myelin and Microvessel Damage, and Enhancement of Neurogenesis in the Aged Gerbil Hippocampus After Ischemic Stroke. *Neurorehabil Neural Repair*, 30 (9):894-905.
- Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 137 (4):433-457.
- Altman J, Das GD. 1965. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*, 207 (5000):953-956.
- Alvarez-Buylla A, Nottebohm F. 1988. Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature*, 335 (6188):353-354.
- Ang ET, Dawe GS, Wong PT, Moochhala S, Ng YK. 2006. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Res*, 1113 (1):186-193.
- Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O. 2001. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci*, 14 (1):10-18.
- Astur RS, Ortiz ML, Sutherland RJ. 1998. A characterization of performance by men and women in a virtual Morris water task: a large and reliable sex difference. *Behav Brain Res*, 93 (1-2):185-190.
- Austin JE, Buckmaster PS. 2004. Recurrent excitation of granule cells with basal dendrites and low interneuron density and inhibitory postsynaptic current frequency in the dentate gyrus of macaque monkeys. *J Comp Neurol*, 476 (3):205-218.
- Beamer EH, Jurado-Arjona J, Jimenez-Mateos EM, Morgan J, Reschke CR, Kenny A, de Leo G, Olivos-Ore LA, Arribas-Blazquez M, Madden SF, Merchán-Rubira J, Delanty N, Farrell MA, O'Brien DF, Avila J, Diaz-Hernandez M, Miras-Portugal MT, Artalejo AR, Hernandez F, Henshall DC, Engel T. 2018. MicroRNA-22 Controls Aberrant Neurogenesis and Changes in Neuronal Morphology After Status Epilepticus. *Front Mol Neurosci*, 11:442.
- Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, Schonewille WJ, Vos JA, Nederkoorn PJ, Wermer MJ, van Walderveen MA, Staals J, Hofmeijer J, van Oostayen JA, Lycklama a Nijeholt GJ, Boiten J, Brouwer PA, Emmer BJ, de Bruijn SF, van Dijk LC, Kappelle LJ, Lo RH, van Dijk EJ, de Vries J, de Kort PL, van Rooij WJ, van den Berg JS, van Hasselt BA, Aerden LA, Dallinga RJ, Visser MC, Bot JC, Vroomen PC, Eshghi O, Schreuder TH, Heijboer RJ, Keizer K, Tielbeek AV, den Hertog HM, Gerrits DG, van den Berg-Vos RM, Karas GB, Steyerberg EW, Flach HZ, Marquering HA, Sprengers ME, Jenniskens SF, Beenen LF, van den Berg R, Koudstaal PJ, van Zwam WH, Roos YB, van der Lugt A, van Oostenbrugge RJ, Majoie CB, Dippel DW, Investigators MC. 2015. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 372 (1):11-20.
- Bielefeld P, Dura I, Danielewicz J, Lucassen PJ, Baekelandt V, Abrous DN, Encinas JM, Fitzsimons CP. 2019. Insult-induced aberrant hippocampal neurogenesis:

- functional consequences and possible therapeutic strategies. *Behav Brain Res*:112032.
- Blum S, Luchsinger JA, Manly JJ, Schupf N, Stern Y, Brown TR, DeCarli C, Small SA, Mayeux R, Brickman AM. 2012. Memory after silent stroke: hippocampus and infarcts both matter. *Neurology*, 78 (1):38-46.
- Bracard S, Ducrocq X, Mas JL, Soudant M, Oppenheim C, Moulin T, Guillemin F, investigators T. 2016. Mechanical thrombectomy after intravenous alteplase versus alteplase alone after stroke (THRACE): a randomised controlled trial. *Lancet Neurol*, 15 (11):1138-1147.
- Brainin M, Tuomilehto J, Heiss WD, Bornstein NM, Bath PM, Teuschl Y, Richard E, Guekht A, Quinn T, Post Stroke Cognition Study G. 2015. Post-stroke cognitive decline: an update and perspectives for clinical research. *Eur J Neurol*, 22 (2):229-238, e213-226.
- Brott T, Bogousslavsky J. 2000. Treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 343 (10):710-722.
- Burghardt NS, Park EH, Hen R, Fenton AA. 2012. Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus*, 22 (9):1795-1808.
- Campbell BC, Mitchell PJ, Dowling RJ, Yan B, Donnan GA, Davis SM. 2015. Endovascular Therapy Proven for Stroke - Finally! *Heart Lung Circ*, 24 (8):733-735.
- Carmichael ST. 2005. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*, 2 (3):396-409.
- Ceanga M, Keiner S, Grunewald B, Haselmann H, Frahm C, Couillard-Despres S, Witte OW, Redecker C, Geis C, Kunze A. 2019. Stroke Accelerates and Uncouples Intrinsic and Synaptic Excitability Maturation of Mouse Hippocampal DCX(+) Adult-Born Granule Cells. *J Neurosci*, 39 (9):1755-1766.
- Chambers RA. 2013. Adult hippocampal neurogenesis in the pathogenesis of addiction and dual diagnosis disorders. *Drug Alcohol Depend*, 130 (1-3):1-12.
- Chehrehasa F, Meedeniya AC, Dwyer P, Abrahamsen G, Mackay-Sim A. 2009. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *J Neurosci Methods*, 177 (1):122-130.
- Chen L, Gong S, Shan LD, Xu WP, Zhang YJ, Guo SY, Hisamitsu T, Yin QZ, Jiang XH. 2006. Effects of exercise on neurogenesis in the dentate gyrus and ability of learning and memory after hippocampus lesion in adult rats. *Neurosci Bull*, 22 (1):1-6.
- Cho KO, Lybrand ZR, Ito N, Brulet R, Tafacory F, Zhang L, Good L, Ure K, Kernie SG, Birnbaum SG, Scharfman HE, Eisch AJ, Hsieh J. 2015. Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. *Nat Commun*, 6:6606.
- Choi SH, Bylykbashi E, Chatila ZK, Lee SW, Pulli B, Clemenson GD, Kim E, Rompala A, Oram MK, Asselin C, Aronson J, Zhang C, Miller SJ, Lesinski A, Chen JW, Kim DY, van Praag H, Spiegelman BM, Gage FH, Tanzi RE. 2018. Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer's mouse model. *Science*, 361 (6406).
- Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, Jr., Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ. 2009. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*, 325 (5937):210-213.
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. 2007. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci*, 30 (9):464-472.

- Cuartero MI, de la Parra J, Perez-Ruiz A, Bravo-Ferrer I, Duran-Laforet V, Garcia-Culebras A, Garcia-Segura JM, Dhaliwal J, Frankland PW, Lizasoain I, Moro MA. 2019. Abolition of aberrant neurogenesis ameliorates cognitive impairment after stroke in mice. *J Clin Invest*, 129 (4):1536-1550.
- del Rio JA, Soriano E. 1989. Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res*, 49 (2):311-317.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH. 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci*, 11 (5):339-350.
- Deng W, Saxe MD, Gallina IS, Gage FH. 2009. Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *J Neurosci*, 29 (43):13532-13542.
- Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. 2008. Stroke. *Lancet*, 371 (9624):1612-1623.
- Driscoll I, Hamilton DA, Petropoulos H, Yeo RA, Brooks WM, Baumgartner RN, Sutherland RJ. 2003. The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings. *Cereb Cortex*, 13 (12):1344-1351.
- Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, Abrous DN, Piazza PV. 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One*, 3 (4):e1959.
- Dupret D, Fabre A, Dobrossy MD, Panatier A, Rodriguez JJ, Lamarque S, Lemaire V, Olier SH, Piazza PV, Abrous DN. 2007. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol*, 5 (8):e214.
- Duveau V, Laustela S, Barth L, Gianolini F, Vogt KE, Keist R, Chandra D, Homanics GE, Rudolph U, Fritschy JM. 2011. Spatiotemporal specificity of GABAA receptor-mediated regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 34 (3):362-373.
- Eadie BD, Redila VA, Christie BR. 2005. Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. *J Comp Neurol*, 486 (1):39-47.
- Eichenbaum H. 2000. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci*, 1 (1):41-50.
- Encinas JM, Michurina TV, Peunova N, Park JH, Tordo J, Peterson DA, Fishell G, Koulakov A, Enikolopov G. 2011. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 8 (5):566-579.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4 (11):1313-1317.
- Evans RL, Connis RT, Hendricks RD, Haselkorn JK. 1995. Multidisciplinary rehabilitation versus medical care: a meta-analysis. *Soc Sci Med*, 40 (12):1699-1706.
- Fares RP, Belmeguenai A, Sanchez PE, Kouchi HY, Bodennec J, Morales A, Georges B, Bonnet C, Bouvard S, Sloviter RS, Bezin L. 2013. Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats. *PLoS One*, 8 (1):e53888.
- Garthe A, Kempermann G. 2013. An old test for new neurons: refining the Morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci*, 7:63.

- Garthe A, Behr J, Kempermann G. 2009. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One*, 4 (5):e5464.
- Garthe A, Roeder I, Kempermann G. 2016. Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, 26 (2):261-271.
- Garthe A, Huang Z, Kaczmarek L, Filipkowski RK, Kempermann G. 2014. Not all water mazes are created equal: cyclin D2 knockout mice with constitutively suppressed adult hippocampal neurogenesis do show specific spatial learning deficits. *Genes Brain Behav*, 13 (4):357-364.
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H. 2006. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439 (7076):589-593.
- Geibig CS, Keiner S, Redecker C. 2012. Functional recruitment of newborn hippocampal neurons after experimental stroke. *Neurobiol Dis*, 46 (2):431-439.
- Gomez-Pinilla F, Dao L, So V. 1997. Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. *Brain Res*, 764 (1-2):1-8.
- Gorantla VR, Sirigiri A, Volkova YA, Millis RM. 2016. Effects of Swimming Exercise on Limbic and Motor Cortex Neurogenesis in the Kainate-Lesion Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, 2016:3915767.
- Gorter JA, Iyer A, White I, Colzi A, van Vliet EA, Sisodiya S, Aronica E. 2014. Hippocampal subregion-specific microRNA expression during epileptogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*, 62:508-520.
- Gould E, Tanapat P, Hastings NB, Shors TJ. 1999. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci*, 3 (5):186-192.
- Group GBDNDC. 2017. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol*, 16 (11):877-897.
- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH, et al. 1995. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA*, 274 (13):1017-1025.
- Han H, Wu LM, Han MX, Yang WM, Wang YX, Fang ZH. 2016. Diabetes impairs spatial learning and memory and hippocampal neurogenesis via BDNF in rats with transient global ischemia. *Brain Res Bull*, 124:269-277.
- Hazell AS. 2007. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int*, 50 (7-8):941-953.
- Hester MS, Danzer SC. 2013. Accumulation of abnormal adult-generated hippocampal granule cells predicts seizure frequency and severity. *J Neurosci*, 33 (21):8926-8936.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R. 2008. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci*, 11 (10):1153-1161.
- Jessberger S, Parent JM. 2015. Epilepsy and Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7 (12).
- Jessberger S, Romer B, Babu H, Kempermann G. 2005. Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells. *Exp Neurol*, 196 (2):342-351.

- Jessberger S, Zhao C, Toni N, Clemenson GD, Jr., Li Y, Gage FH. 2007a. Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling. *J Neurosci*, 27 (35):9400-9407.
- Jessberger S, Clark RE, Broadbent NJ, Clemenson GD, Jr., Consiglio A, Lie DC, Squire LR, Gage FH. 2009. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learn Mem*, 16 (2):147-154.
- Jessberger S, Nakashima K, Clemenson GD, Jr., Mejia E, Mathews E, Ure K, Ogawa S, Sinton CM, Gage FH, Hsieh J. 2007b. Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline. *J Neurosci*, 27 (22):5967-5975.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA. 2001. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (8):4710-4715.
- Jin Y, Barnett A, Zhang Y, Yu X, Luo Y. 2017. Poststroke Sonic Hedgehog Agonist Treatment Improves Functional Recovery by Enhancing Neurogenesis and Angiogenesis. *Stroke*, 48 (6):1636-1645.
- Jokinen H, Melkas S, Ylikoski R, Pohjasvaara T, Kaste M, Erkinjuntti T, Hietanen M. 2015. Post-stroke cognitive impairment is common even after successful clinical recovery. *Eur J Neurol*, 22 (9):1288-1294.
- Jung KH, Chu K, Kim M, Jeong SW, Song YM, Lee ST, Kim JY, Lee SK, Roh JK. 2004. Continuous cytosine-b-D-arabinofuranoside infusion reduces ectopic granule cells in adult rat hippocampus with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Eur J Neurosci*, 19 (12):3219-3226.
- Kaplan MS, Hinds JW. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197 (4308):1092-1094.
- Katan M, Luft A. 2018. Global Burden of Stroke. *Semin Neurol*, 38 (2):208-211.
- Kathner-Schaffert C, Karapetow L, Gunther M, Rudolph M, Dahab M, Baum E, Lehmann T, Witte OW, Redecker C, Schmeer CW, Keiner S. 2019. Early Stroke Induces Long-Term Impairment of Adult Neurogenesis Accompanied by Hippocampal-Mediated Cognitive Decline. *Cells*, 8 (12).
- Keiner S, Walter J, Oberland J, Redecker C. 2010. Contribution of constitutively proliferating precursor cell subtypes to dentate neurogenesis after cortical infarcts. *BMC Neurosci*, 11:146.
- Keiner S, Wurm F, Kunze A, Witte OW, Redecker C. 2008. Rehabilitative therapies differentially alter proliferation and survival of glial cell populations in the perilesional zone of cortical infarcts. *Glia*, 56 (5):516-527.
- Kempermann G. 2011. Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 33 (6):1018-1024.
- Kempermann G. 2012. New neurons for 'survival of the fittest'. *Nat Rev Neurosci*, 13 (10):727-736.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997a. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (19):10409-10414.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997b. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386 (6624):493-495.
- Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. 1998. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol*, 8 (16):939-942.

- Kempermann G, Gast D, Gage FH. 2002. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol*, 52 (2):135-143.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 27 (8):447-452.
- Kempermann G, Fabel K, Ehninger D, Babu H, Leal-Galicia P, Garthe A, Wolf SA. 2010. Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity. *Front Neurosci*, 4:189.
- Kluska MM, Witte OW, Bolz J, Redecker C. 2005. Neurogenesis in the adult dentate gyrus after cortical infarcts: effects of infarct location, N-methyl-D-aspartate receptor blockade and anti-inflammatory treatment. *Neuroscience*, 135 (3):723-735.
- Kohler SJ, Williams NI, Stanton GB, Cameron JL, Greenough WT. 2011. Maturation time of new granule cells in the dentate gyrus of adult macaque monkeys exceeds six months. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (25):10326-10331.
- Kollen B, Kwakkel G, Lindeman E. 2006. Functional recovery after stroke: a review of current developments in stroke rehabilitation research. *Rev Recent Clin Trials*, 1 (1):75-80.
- Kronenberg G, Bick-Sander A, Bunk E, Wolf C, Ehninger D, Kempermann G. 2006. Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol Aging*, 27 (10):1505-1513.
- Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G. 2003. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*, 467 (4):455-463.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*, 16 (6):2027-2033.
- Kunze A, Grass S, Witte OW, Yamaguchi M, Kempermann G, Redecker C. 2006. Proliferative response of distinct hippocampal progenitor cell populations after cortical infarcts in the adult brain. *Neurobiol Dis*, 21 (2):324-332.
- Lackland DT, Roccella EJ, Deutsch AF, Fornage M, George MG, Howard G, Kissela BM, Kittner SJ, Lichtman JH, Lisabeth LD, Schwamm LH, Smith EE, Towfighi A, American Heart Association Stroke C, Council on C, Stroke N, Council on Quality of C, Outcomes R, Council on Functional G, Translational B. 2014. Factors influencing the decline in stroke mortality: a statement from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 45 (1):315-353.
- Laplagne DA, Esposito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage FH, Schinder AF. 2006. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol*, 4 (12):e409.
- Leuner B, Gould E, Shors TJ. 2006. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus*, 16 (3):216-224.
- Lindvall O, Kokaia Z. 2015. Neurogenesis following Stroke Affecting the Adult Brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7 (11).
- Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. 1998. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci*, 18 (19):7768-7778.
- Livingston-Thomas J, Nelson P, Karthikeyan S, Antonescu S, Jeffers MS, Marzolini S, Corbett D. 2016. Exercise and Environmental Enrichment as Enablers of

- Task-Specific Neuroplasticity and Stroke Recovery. *Neurotherapeutics*, 13 (2):395-402.
- Logan PA, Gladman JR, Avery A, Walker MF, Dyas J, Groom L. 2004. Randomised controlled trial of an occupational therapy intervention to increase outdoor mobility after stroke. *BMJ*, 329 (7479):1372-1375.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (5):2074-2077.
- Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Gotz M, Haas CA, Kempermann G, Taylor V, Giachino C. 2010. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*, 6 (5):445-456.
- Luo CX, Jiang J, Zhou QG, Zhu XJ, Wang W, Zhang ZJ, Han X, Zhu DY. 2007. Voluntary exercise-induced neurogenesis in the postischemic dentate gyrus is associated with spatial memory recovery from stroke. *J Neurosci Res*, 85 (8):1637-1646.
- Markakis EA, Gage FH. 1999. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol*, 406 (4):449-460.
- Markgraf CG, Green EJ, Hurwitz BE, Morikawa E, Dietrich WD, McCabe PM, Ginsberg MD, Schneiderman N. 1992. Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*, 575 (2):238-246.
- Marlier Q, Verteneuil S, Vandenbosch R, Malgrange B. 2015. Mechanisms and Functional Significance of Stroke-Induced Neurogenesis. *Front Neurosci*, 9:458.
- Matsumori Y, Hong SM, Fan Y, Kayama T, Hsu CY, Weinstein PR, Liu J. 2006. Enriched environment and spatial learning enhance hippocampal neurogenesis and salvages ischemic penumbra after focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*, 22 (1):187-198.
- Mijajlovic MD, Pavlovic A, Brainin M, Heiss WD, Quinn TJ, Ihle-Hansen HB, Hermann DM, Assayag EB, Richard E, Thiel A, Kliper E, Shin YI, Kim YH, Choi S, Jung S, Lee YB, Sinanovic O, Levine DA, Schlesinger I, Mead G, Milosevic V, Leys D, Hagberg G, Ursin MH, Teuschl Y, Prokopenko S, Mozheyko E, Bezdenezhnykh A, Matz K, Aleksic V, Muresanu D, Korczyn AD, Bornstein NM. 2017. Post-stroke dementia - a comprehensive review. *BMC Med*, 15 (1):11.
- Mooney C, Becker BA, Raoof R, Henshall DC. 2016. EpimiRBase: a comprehensive database of microRNA-epilepsy associations. *Bioinformatics*, 32 (9):1436-1438.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297 (5868):681-683.
- Moscovitch M, Rosenbaum RS, Gilboa A, Addis DR, Westmacott R, Grady C, McAndrews MP, Levine B, Black S, Winocur G, Nadel L. 2005. Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J Anat*, 207 (1):35-66.
- Murphy BL, Pun RY, Yin H, Faulkner CR, Loepke AW, Danzer SC. 2011. Heterogeneous integration of adult-generated granule cells into the epileptic brain. *J Neurosci*, 31 (1):105-117.

- Myers CE, Bermudez-Hernandez K, Scharfman HE. 2013. The influence of ectopic migration of granule cells into the hilus on dentate gyrus-CA3 function. *PLoS One*, 8 (6):e68208.
- Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. 1996. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res*, 726 (1-2):49-56.
- Niv F, Keiner S, Krishna, Witte OW, Lie DC, Redecker C. 2012. Aberrant neurogenesis after stroke: a retroviral cell labeling study. *Stroke*, 43 (9):2468-2475.
- Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuva P, Yavagal DR, Ribo M, Cognard C, Hanel RA, Sila CA, Hassan AE, Millan M, Levy EI, Mitchell P, Chen M, English JD, Shah QA, Silver FL, Pereira VM, Mehta BP, Baxter BW, Abraham MG, Cardona P, Veznedaroglu E, Hellinger FR, Feng L, Kirmani JF, Lopes DK, Jankowitz BT, Frankel MR, Costalat V, Vora NA, Yoo AJ, Malik AM, Furlan AJ, Rubiera M, Aghaebrahim A, Olivot JM, Tekle WG, Shields R, Graves T, Lewis RJ, Smith WS, Liebeskind DS, Saver JL, Jovin TG, Investigators DT. 2018. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N Engl J Med*, 378 (1):11-21.
- O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, Rangarajan S, Islam S, Pais P, McQueen MJ, Mondo C, Damasceno A, Lopez-Jaramillo P, Hankey GJ, Dans AL, Yusuf S, Truelsen T, Diener HC, Sacco RL, Ryglewicz D, Czlonkowska A, Weimar C, Wang X, Yusuf S, investigators I. 2010. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet*, 376 (9735):112-123.
- O'Keefe J, Nadel L. 1978. *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford New York: Clarendon Press ; Oxford University Press.
- Overstreet-Wadiche LS, Westbrook GL. 2006. Functional maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus*, 16 (3):208-215.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. 1997. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 17 (10):3727-3738.
- Patel LS, Wenzel HJ, Schwartzkroin PA. 2004. Physiological and morphological characterization of dentate granule cells in the p35 knock-out mouse hippocampus: evidence for an epileptic circuit. *J Neurosci*, 24 (41):9005-9014.
- Pollock A, Baer G, Campbell P, Choo PL, Forster A, Morris J, Pomeroy VM, Langhorne P. 2014. Physical rehabilitation approaches for the recovery of function and mobility following stroke. *Cochrane Database Syst Rev*, (4):CD001920.
- Prins ND, van Dijk EJ, den Heijer T, Vermeer SE, Jolles J, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. 2005. Cerebral small-vessel disease and decline in information processing speed, executive function and memory. *Brain*, 128 (Pt 9):2034-2041.
- Rabadi M, Galgano M, Lynch D, Akerman M, Lesser M, Volpe B. 2008. A pilot study of activity-based therapy in the arm motor recovery post stroke: a randomized controlled trial. *Clin Rehabil*, 22 (12):1071-1082.
- Rangel LM, Alexander AS, Aimone JB, Wiles J, Gage FH, Chiba AA, Quinn LK. 2014. Temporally selective contextual encoding in the dentate gyrus of the hippocampus. *Nat Commun*, 5:3181.

- Rao MS, Shetty AK. 2004. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, 19 (2):234-246.
- Rasquin SM, Lodder J, Verhey FR. 2005. Predictors of reversible mild cognitive impairment after stroke: a 2-year follow-up study. *J Neurol Sci*, 229-230:21-25.
- Ribak CE, Tran PH, Spigelman I, Okazaki MM, Nadler JV. 2000. Status epilepticus-induced hilar basal dendrites on rodent granule cells contribute to recurrent excitatory circuitry. *J Comp Neurol*, 428 (2):240-253.
- Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M. 2006. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*, 24 (7):1850-1856.
- Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R. 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472 (7344):466-470.
- Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia AD, Sofroniew MV, Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR. 2006. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (46):17501-17506.
- Schaapsmeeders P, Maaijwee NA, van Dijk EJ, Rutten-Jacobs LC, Arntz RM, Schoonderwaldt HC, Dorresteijn LD, Kessels RP, de Leeuw FE. 2013. Long-term cognitive impairment after first-ever ischemic stroke in young adults. *Stroke*, 44 (6):1621-1628.
- Scharfman H, Goodman J, McCloskey D. 2007. Ectopic granule cells of the rat dentate gyrus. *Dev Neurosci*, 29 (1-2):14-27.
- Schmidt A, Diederich K, Strecker JK, Geng B, Hoppen M, Duning T, Schabitz WR, Minnerup J. 2015. Progressive cognitive deficits in a mouse model of recurrent photothrombotic stroke. *Stroke*, 46 (4):1127-1131.
- Scoville WB, Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20 (1):11-21.
- Shapiro LA, Ribak CE. 2005. Integration of newly born dentate granule cells into adult brains: hypotheses based on normal and epileptic rodents. *Brain Res Brain Res Rev*, 48 (1):43-56.
- Shapiro LA, Ribak CE, Jessberger S. 2008. Structural changes for adult-born dentate granule cells after status epilepticus. *Epilepsia*, 49 Suppl 5:13-18.
- Sharp FR, Liu J, Bernabeu R. 2002. Neurogenesis following brain ischemia. *Brain Res Dev Brain Res*, 134 (1-2):23-30.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. 2002. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, 12 (5):578-584.
- Sierra A, Martin-Suarez S, Valcarcel-Martin R, Pascual-Brazo J, Aelvoet SA, Abiega O, Deudero JJ, Brewster AL, Bernaldes I, Anderson AE, Baekelandt V, Maletic-Savatic M, Encinas JM. 2015. Neuronal hyperactivity accelerates depletion of neural stem cells and impairs hippocampal neurogenesis. *Cell Stem Cell*, 16 (5):488-503.
- Snyder JS, Glover LR, Sanzone KM, Kamhi JF, Cameron HA. 2009a. The effects of exercise and stress on the survival and maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus*, 19 (10):898-906.
- Snyder JS, Choe JS, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, Brown A, Kamhi JF, Cameron HA. 2009b. Adult-born hippocampal neurons are more numerous,

- faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *J Neurosci*, 29 (46):14484-14495.
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Bostrom E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisen J. 2013. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153 (6):1219-1227.
- Steiner B, Zurborg S, Horster H, Fabel K, Kempermann G. 2008. Differential 24 h responsiveness of Prox1-expressing precursor cells in adult hippocampal neurogenesis to physical activity, environmental enrichment, and kainic acid-induced seizures. *Neuroscience*, 154 (2):521-529.
- Stummer W, Weber K, Tranmer B, Baethmann A, Kempfski O. 1994. Reduced Mortality and Brain-Damage after Locomotor-Activity in Gerbil Forebrain Ischemia. *Stroke*, 25 (9):1862-1869.
- Stummer W, Baethmann A, Murr R, Schurer L, Kempfski OS. 1995. Cerebral Protection against Ischemia by Locomotor-Activity in Gerbils - Underlying Mechanisms. *Stroke*, 26 (8):1423-1429.
- Sun H, Li A, Hou T, Tao X, Chen M, Wu C, Chen S, Zhu L, Liao H. 2019. Neurogenesis promoted by the CD200/CD200R signaling pathway following treadmill exercise enhances post-stroke functional recovery in rats. *Brain Behav Immun*, 82:354-371.
- Svensson M, Hallin T, Broms J, Ekstrand J, Tingstrom A. 2017. Spatial memory impairment in Morris water maze after electroconvulsive seizures. *Acta Neuropsychiatr*, 29 (1):17-26.
- Takasawa K, Kitagawa K, Yagita Y, Sasaki T, Tanaka S, Matsushita K, Ohstuki T, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M. 2002. Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22 (3):299-307.
- Teasdale TW, Engberg AW. 2005. Psychosocial consequences of stroke: a long-term population-based follow-up. *Brain Inj*, 19 (12):1049-1058.
- Toda T, Gage FH. 2018. Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell Tissue Res*, 373 (3):693-709.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF. 2008. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci*, 11 (8):901-907.
- Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, van Praag H, Martone ME, Ellisman MH, Gage FH. 2007. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci*, 10 (6):727-734.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. 2005. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47 (6):803-815.
- Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*, 21 (5):1628-1634.
- Tureyen K, Vemuganti R, Sailor KA, Bowen KK, Dempsey RJ. 2004. Transient focal cerebral ischemia-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the adult mouse. *J Neurosurg*, 101 (5):799-805.
- Twitchell TE. 1951. The restoration of motor function following hemiplegia in man. *Brain*, 74 (4):443-480.
- Vadodaria KC, Gage FH. 2014. SnapShot: adult hippocampal neurogenesis. *Cell*, 156 (5):1114-1114 e1111.

- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 1999a. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 2 (3):266-270.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. 1999b. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (23):13427-13431.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*, 25 (38):8680-8685.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415 (6875):1030-1034.
- Vermeer SE, Prins ND, den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. 2003. Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N Engl J Med*, 348 (13):1215-1222.
- Vivar C, Potter MC, van Praag H. 2013. All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. *Curr Top Behav Neurosci*, 15:189-210.
- Walter C, Murphy BL, Pun RY, Spieles-Engemann AL, Danzer SC. 2007. Pilocarpine-induced seizures cause selective time-dependent changes to adult-generated hippocampal dentate granule cells. *J Neurosci*, 27 (28):7541-7552.
- Walter J, Keiner S, Witte OW, Redecker C. 2010. Differential stroke-induced proliferative response of distinct precursor cell subpopulations in the young and aged dentate gyrus. *Neuroscience*, 169 (3):1279-1286.
- Walter J, Keiner S, Witte OW, Redecker C. 2011. Age-related effects on hippocampal precursor cell subpopulations and neurogenesis. *Neurobiol Aging*, 32 (10):1906-1914.
- Wang C, Zhang M, Sun C, Cai Y, You Y, Huang L, Liu F. 2011. Sustained increase in adult neurogenesis in the rat hippocampal dentate gyrus after transient brain ischemia. *Neurosci Lett*, 488 (1):70-75.
- Wiltrout C, Lang B, Yan Y, Dempsey RJ, Vemuganti R. 2007. Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis. *Neurochem Int*, 50 (7-8):1028-1041.
- Winter B, Bert B, Fink H, Dirnagl U, Endres M. 2004. Dysexecutive syndrome after mild cerebral ischemia? Mice learn normally but have deficits in strategy switching. *Stroke*, 35 (1):191-195.
- Wolf SL, Winstein CJ, Miller JP, Thompson PA, Taub E, Uswatte G, Morris D, Blanton S, Nichols-Larsen D, Clark PC. 2008. Retention of upper limb function in stroke survivors who have received constraint-induced movement therapy: the EXCITE randomised trial. *Lancet Neurol*, 7 (1):33-40.
- Wurm F, Keiner S, Kunze A, Witte OW, Redecker C. 2007. Effects of skilled forelimb training on hippocampal neurogenesis and spatial learning after focal cortical infarcts in the adult rat brain. *Stroke*, 38 (10):2833-2840.
- Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa K, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M. 2001. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke*, 32 (8):1890-1896.
- Yu TS, Washington PM, Kernie SG. 2016. Injury-Induced Neurogenesis: Mechanisms and Relevance. *Neuroscientist*, 22 (1):61-71.
- Zhang CL, Zou Y, He W, Gage FH, Evans RM. 2008. A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature*, 451 (7181):1004-1007.

- Zhang R, Zhang Z, Wang L, Wang Y, Gousev A, Zhang L, Ho KL, Morshead C, Chopp M. 2004. Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24 (4):441-448.
- Zhao C, Deng W, Gage FH. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132 (4):645-660.
- Zhao C, Wang J, Zhao S, Nie Y. 2009. Constraint-induced movement therapy enhanced neurogenesis and behavioral recovery after stroke in adult rats. *Tohoku J Exp Med*, 218 (4):301-308.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH. 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci*, 26 (1):3-11.

## 10 Anhang

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Gyrus dentatus des Hippocampus mit reifen Neuronen.....	8
Abbildung 2: Darstellung der Phasen der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus der Hippocampusformation.....	9
Abbildung 3: Darstellung regulär- und aberrant-integrierter Neuronen.....	13
Abbildung 4: Schematische und bildliche Darstellung des Versuchsaufbaus des modifizierten MWM nach Garthe et al, 2009.....	15

## 10.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Florus Voitke  
 Geburtsdatum und -ort: 06.08.1989 in Altenburg  
 Familienstand: ledig

### schulische Ausbildung

1996–2000 Grundschule Erich-Mäder Altenburg  
 2000–2008 Lerchenberggymnasium Altenburg (Abitur mit  
 Gesamtnote 1,3)

### Universitäre Ausbildung

2009–2016 Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität  
 Jena (3. Staatsexamen mit Gesamtnote 1,33)

### Tätigkeit im klinischen Bereich

Praktisches Jahr  
 2015–2016 Neurologie am Universitätsklinikum Jena  
 2016 Innere Medizin am Robert-Koch-Krankenhaus  
 Apolda  
 2016 Chirurgie am Kantonspital Laufen (Schweiz)

Assistenzarzt  
 2017–2019 klinische Notfallmedizin am Universitätsklinikum  
 Jena  
 Seit 2019 Anästhesiologie am Universitätsklinikum Leipzig

**Tätigkeit in der medizinischen Forschung**

2013–2014	experimentelle Arbeit im Forschungszentrum des Universitätsklinikums Jena mit einem Promotionsstipendium gestiftet durch das Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung Jena (IZKF) in der Arbeitsgruppe: „Neurale Stammzellen und adulte Neurogenese“, experimentelle Neurologie, Jena
2014	Posterpräsentation Keystone Symposium „Adult Neurogenesis“ in Stockholm
2015	Posterpräsentation Abcam Kongress „Adult Neurogenesis“ in Dresden
2017	Publikation „Adult hippocampal neurogenesis poststroke: More new granule cells but aberrant morphology and impaired spatial memory“

### 10.3 Danksagung

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. O. W. Witte für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und für deren Begutachtung danken.

Außerdem möchte ich meinem ehemaligen Doktorvater Prof. Dr. med. Christoph Redecker herzlich danken, der mich in seine Arbeitsgruppe „Neurale Stammzellen und adulte Neurogenese“ aufnahm und mich während der ersten vier Jahre der Doktorarbeit betreute. Er stand mir bei der Entwicklung der Studie sowie der Etablierung und Durchführung der Experimente zur Seite.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin im Forschungszentrum Lobeda Dr. Silke Keiner, die jederzeit für mich da war und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Dies war sowohl zu Beginn der Arbeit bei der Durchführung der Experimente und deren Auswertung der Fall wie auch am Ende bei der Anfertigung der Publikation und der Promotionsschrift.

Weiterhin möchte ich PD Dr. med. Albrecht Kunze danken, der ebenfalls Teil der Arbeitsgruppe war. Dabei half er mit seinem Rat bei der Interpretation der Ergebnisse und hatte einen großen Anteil bei der Anfertigung der Publikation.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen, insbesondere Mihai Ceanga, Max Rudolph, Lina Patzig, Carolin Kathner-Schaffert und Priscilla Blümel bedanken, mit denen eine entspannte Arbeitsatmosphäre und ein reger Austausch über die Arbeit möglich war.

Des Weiteren gilt mein Dank den technischen Assistenten der experimentellen Neurologie, vor allem Frau Julia Karius, welche mir zahlreiche Verfahren erlernten und mich bei der Durchführung der Experimente unterstützten.

Außerdem möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken, die mir auf meinem Weg zur Seite standen und ohne die diese Publikationsschrift nicht angefertigt worden wäre. Dabei hat meine Familie mir den Weg zu diesem Punkt überhaupt erst

ermöglicht und war eine Stütze, auf die ich mich immer verlassen konnte. Insbesondere möchte ich aber meiner Freundin Danièle danken, die immer an mich geglaubt hat und mir die nötige Motivation und die nötige Disziplin gegeben hat, um die Arbeit fertig zu stellen. Besonders bei der Anfertigung der kumulativen Arbeit war sie eine unglaubliche Stütze.

Ich möchte mich schließlich für das Verständnis der mir nahestehenden Menschen bedanken, wenn ich sie aufgrund der Doktorarbeit vernachlässigt habe.

## 10.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Dr. rer. nat. Silke Keiner

PD Dr. med. Albrecht Kunze

Prof. Dr. med. Christoph Redecker

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Leipzig, den 08.07.2021

.....