

**Funktionelle Integration
neu gebildeter hippocampaler Neurone
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 Christiane Susanne Geibig
geboren am 08.04.1981 in Darmstadt**

Gutachter:

1. Prof. Dr. C. Redecker, Jena
2. Prof. Dr. Dr. C. Redies, Jena
3. Prof. Dr. J. Winkler, Erlangen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.01.2012

Abkürzungsverzeichnis

BrdU	5-Bromo-2-Deoxyuridin, ein Proliferationsmarker
CA1-3	cornu ammonis, Ammonshornformation
c-fos	ein immediate early gene
DG	dentate gyrus, Gyrus dentatus des Hippokampus
EE	enriched environment, reizreiche Umgebung
GABA	γ -aminobutyric acid, γ -Aminobuttersäure, ein Neurotransmitter
GCL	granule cell layer, Körnerzellschicht
IEG	immediate early gene
LB	ladder beam, Leiterlauf
LTP	long-term potentiation, langandauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
NeuN	neuronal nuclei, ein neuronaler Marker
NMDA	N-methyl-D-aspartat, ein Aminosäurederivat
PFA	phosphatgepufferte Paraformaldehydlösung
RW	running wheel, Laufrad
SGZ	subgranular zone, Subgranularzone
ST	Standard Kontrollgruppe
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
WM	water maze, Wasserlabyrinth nach Morris
zif268	zinkfinger-binding protein, ein immediate early gene

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	5
2. Einleitung	7
3. Ziele der Arbeit.....	12
4. Methodik	13
4.1. Induktion der kortikalen Infarkte	13
4.2. Experimentelles Design.....	14
4.3. Wasserlabyrinth nach Morris	16
4.4. Leiterlauf.....	16
4.5. Gewebeaufarbeitung	17
4.6. Infarktvolumentrie	17
4.7. Immunhistochemie	18
4.8. Immunfluoreszenz	19
4.9. Quantifizierung und konfokale Lasermikroskopie	20
4.10. Statistik	21
5. Ergebnisse	22
5.1. Neu generierte Neurone reagieren auf Aktivierungsaufgaben.....	22
5.2. Generelle Aktivierung des Gyrus dentatus	24
5.3. Trainingseffekte auf die Neurogenese und Lernleistung	25
5.4. Postischämisches Training beeinflusst Aktivierbarkeit nicht.....	26
5.5. Kognitive Aktivierung stimuliert vorwiegend neue Neurone der GCL	28
5.6. Stärkere Zif268 Expression nach beiden Aktivierungsaufgaben	30
6. Diskussion.....	32
6.1. Aktivierbarkeit neuer hippocamopaler Neurone nach Ischämie.....	32
6.2. Einfluss des Trainings auf die Neurogenese und die Aktivierbarkeit	34
6.3. Der Gyrus dentatus und sensomotorische Aktivität.....	36
7. Schlussfolgerung	38
8. Literatur- und Quellenverzeichnis	40
9. Anhang	46
9.1. Danksagung	46
9.2. Förderung.....	46
9.3. Lebenslauf.....	47
9.4. Ehrenwörtliche Erklärung	49

1. Zusammenfassung

Innerhalb der neurogenen Nischen, dem Gyrus dentatus des Hippokampus, sowie der Subventrikulärzone, ist das adulte Gehirn in der Lage neue Nervenzellen zu bilden. Die Neurogenese kann durch verschiedene Pathologien, wie zum Beispiel einen Schlaganfall gesteigert werden. Rehabilitatives Training nach fokaler Ischämie steigert die Neurogenese im Hippokampus. Ebenso verbessert eine solche Therapie die Lernfähigkeit und das Absolvieren von Verhaltenstests wie dem Morris Wasserlabyrinth. Unter physiologischen Bedingungen werden neu generierte Nervenzellen in bestehende Netzwerke funktionell integriert. Jedoch ist bisher wenig über die Integration von Nervenzellen bekannt, welche unter pathologischen Bedingungen generiert wurden. Im Rahmen von Studien experimentell induzierter Epilepsie gibt es sogar Hinweise auf eine fehlerhafte Integration einzelner neuer Zellen. Bezüglich der Integration von nach Schlaganfall neu entstandener hippocampaler Neurone liegen bisher keine Daten vor.

Ziel dieser Arbeit war es, die Integration von nach ischämischem Schlaganfall neu entstandenen Neuronen in das bestehende kortiko-hippokampale Netzwerk immunhistochemisch zu untersuchen. Initial sollte in dieser Studie geprüft werden, ob überhaupt eine solche funktionelle Integration stattfindet, im zweiten Teil, in wie weit die Aktivierbarkeit neuer Neurone durch vorausgegangenes Training steigerbar ist, und abschließend stand die Frage, ob es eine aufgabenspezifische Aktivierung der neuen Neurone gibt.

Männliche C57BL/6J Mäuse erhielten einen photochemisch induzierten Hirninfarkt im rechten sensomotorischen Vorderpfoten-Cortex. Die proliferierenden Zellen wurden durch die 13-tägige postoperative Applikation von 5-Bromo-2-Deoxyuridin markiert. Direkt im Anschluss an die Operation wurden die Tiere in die verschiedenen Trainingsgruppen aufgeteilt (Standard, reizreiche Umgebung oder Laufrad), wo sie für insgesamt sechs Wochen trainiert wurden. Nach einer anschließenden einwöchigen Ruhephase erfolgte die erneute Teilung aller Gruppen jeweils auf die Aktivierungsparadigmen Leiterlauf oder Morris Wasserlabyrinth. Exakt 150 min nach Absolvierung der letzten Aktivierung wurden die Tiere zur weiteren Aufarbeitung des Materials transkardial perfundiert. Immunhistochemisch zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Proliferation und des Überlebens von neuen Neuronen

in den Trainingsgruppen verglichen zu den Standard-Kontrollgruppen. Zudem zeigte sich eine Verschiebung proliferierender Zellen der Subgranularzone zugunsten der Körnerzellschicht nach absolviertem Laufradtraining. Es waren in allen experimentellen Subgruppen eine kleine Anzahl neuer Neurone nachweisbar, welche den Aktivitätsmarker c-fos (ein immediate early gene) exprimierten, und somit als funktionell integriert gewertet wurden. Das durchgeführte rehabilitative Training steigerte bemerkenswerterweise den Anteil aktivierter Zellen nicht. Vielmehr wurden, unabhängig vom Trainingsstatus, im Rahmen der ‚sensomotorischen Aufgabe‘ (Leiterlauf) signifikant mehr neue Neurone aktiviert als bei der ‚kognitiven Aufgabe‘ (Morris Wasserlabyrinth). Jedoch zeigten die rehabilitierten Tiere nach Absolvierung des Wasserlabyrinthes eine signifikante Verschiebung aktivierter neuer Neurone hin zur Körnerzellschicht.

Die Ergebnisse zeigen, dass nach Schlaganfall neu generierte Neurone in bestehende hippocampale Netzwerke funktionell integriert werden. Die gesteigerte Aktivierung durch ein sensomotorisches Paradigma führt zu der Überlegung, dass im geschädigten Gehirn neugebildete Nervenzellen an motorischem Lernen beteiligt sein können, wenn auch aufgrund des Verteilungsmusters innerhalb des Gyrus dentatus eher unspezifisch. Betrachtet man dahingegen das spezifische Muster der durch eine kognitive Aufgabe aktivierten neuen Neurone, ist zu diskutieren, ob eine verbesserte Lernfähigkeit eher durch eine selektivere Aktivierung der neuen Neurone der Körnerzellschicht zustande kommt, als durch eine größere Anzahl aktivierter neuer Neurone.

2. Einleitung

Der Gyrus dentatus des Hippokampus und die Subventrikulärzone, beziehungsweise der Bulbus olfactorius, sind Regionen des zentralen Nervensystems, in denen zeitlebens neue Neurone proliferieren und reifen (Cayre et al. 2009). Diese Regionen bezeichnet man als neurogene Nischen, da das hier herrschende Milieu eine Entstehung von neuen Neuronen ermöglicht. Verschiedenste pathologische Stimuli wie cerebrale Ischämie (Jin et al. 2001, Sharp et al. 2002) oder Epilepsie (Parent et al. 1997, Jessberger et al. 2007), aber auch Training und Lernprozesse (Kempermann et al. 1997b, van Praag et al. 1999) steigern erwiesenermaßen die Neurogenese im Gyrus dentatus und in der Subventrikulärzone. Inzwischen gibt es Studien, welche auch dem Cortex eine gewisse neuronale Regenerationstendenz zusprechen (Magavi et al. 2000, Keiner et al. 2009, Sirko et al. 2009, Ohira et al. 2009). Über welche Mechanismen die Neurogenese nach kortikaler Ischämie in den infarktfernen Regionen angeregt wird, ist nicht vollständig geklärt. Eine Hypothese ist eine direkte neuronale Fernwirkung über das kortiko-hippokampale Netzwerk via Neurotransmitter. Eine enge Verknüpfung der Neurogenese besteht auch zu Änderungen der mikroglialen Aktivierung. Nach ischämischem Schlaganfall haben diese Aktivitätsänderungen entweder einen fördernden oder nachteiligen Effekt auf die Neurogenese, abhängig von der Subpopulation der Gliazellen, und dem Zeitpunkt nach Läsion (Ekdahl et al. 2009). Zum Beispiel lässt sich die Neurogenese durch die einmonatige Gabe von Minocyclin, einem tetrazyklischen Antibiotikum und Inhibitor von Mikroglia, steigern. Auf der anderen Seite sind diese Zellen aber auch maßgeblich an den Migrationsprozessen der neuen Neurone in Richtung der Läsion, sowie bei der Ausbildung von funktionellen Synapsen beteiligt. Anhand dieser Ergebnisse erscheint ein Mechanismus über humorale Entzündungsmediatoren wahrscheinlich. Ebenso zu diskutieren ist eine direkte Aktivierung hippokampaler Vorläuferzellen durch die Notwendigkeit von Reorientierungs- und (Um-)Lernprozessen.

Es ist demnach gut belegt, dass die Neurogenese nach Ischämie ansteigt. Die Funktionalität und Bedeutung der neuen Neurone im kortiko-hippokampalen Netzwerk ist jedoch nach wie vor nicht vollständig geklärt. Für das gesunde Gehirn nimmt man an, dass diese Neurone ihre Rolle im Rahmen von

Gedächtniskonsolidierung und räumlichem Lernen wahrnehmen (Shors et al. 2001, Kempermann 2002, Schinder und Gage 2004), sowie der Differenzierung und Kodierung von räumlichen und zeitlichen Mustern dienen (Clelland et al. 2009). Eine weitere Hypothese ist die der Reservevorhaltung von Nervenzellen (Kempermann 2008). Demnach sollen die zeitlebens generierten Neurone dann ihre Funktionalität entfalten (und damit Überleben), wenn das Individuum mit einer neuen Umgebung konfrontiert wird und damit umgehen muss. Die funktionelle Bedeutung von Neurogenese im geschädigten Gehirn ist jedoch weitaus komplexer. Nach einem Status epilepticus werden beispielsweise viele der neuen Neurone abberant integriert und sind möglicherweise an der Unterhaltung weiterer Fehlfunktionen der Hippokampusformation beteiligt (Jessberger et al. 2007). Im Gegensatz dazu sind die erhöhten Neurogeneselevel im Gyrus dentatus nach diversen Schlaganfallmodellen nach verschiedenen rehabilitativen Trainingsformen positiv mit einem besseren funktionellen Outcome korreliert (Wurm et al. 2007, Zhao et al. 2009). Die Stimulation der Vorläuferzellen induziert deren Proliferation, Migration, neuronale Determination und die Differenzierung zu reifen Neuronen (**Abb. 1**). Aus der Subventrikulärzone migrieren die neuen Zellen entlang des rostralen

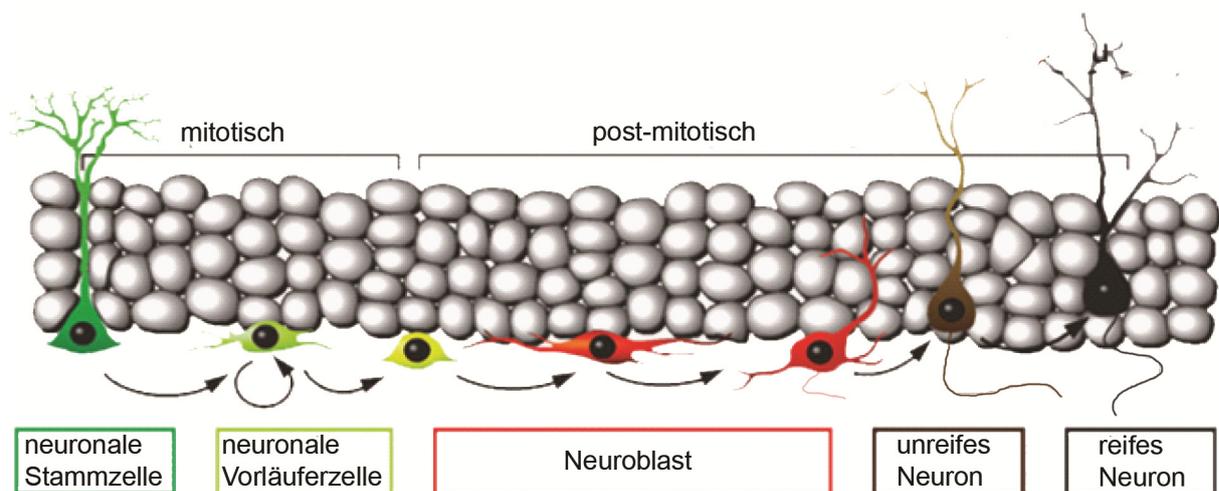


Abbildung 1: Schematische Zeichnung des Gyrus dentatus und der Neurogenese (modifiziert nach Encinas et al. 2006).

Migrationsstroms in den Bulbus olfactorius, im Gyrus dentatus (DG) umfasst die Migration nur wenige Millimeter aus der Subgranularzone (SGZ) in die Körnerzellschicht (GCL). Der Neurotransmitter GABA depolarisiert die frühen Vorläuferzellen und führt so über einen Kalziumeinstrom zur Expression des

Differenzierungsfaktors NeuroD, welcher die weitere neuronale Differenzierung der Vorläuferzellen fördert (Zhao et al. 2008). In jungen, noch unreifen Neuronen führt die GABAerge Depolarisation in der ersten Woche nach Zellteilung zu einem schnellen Wachstum der Dendriten in Richtung GCL und der Axone in Richtung Ammonshornformation (CA3), den regulären Ein- und Ausgangsstrukturen des DG. Die Reizschwelle für den Eingang von LTP (long-term potentiation) ist in diesem Zeitraum erniedrigt, was seinerseits zu einer Förderung der Synapsenbildung führt (Schmidt-Hieber et al. 2004). Ungefähr ab der dritten Woche wirkt GABA inhibitorisch: die Hyperpolarisation führt zu Faseraussprossung und Spinewachstum des jungen Neurons. Ebenfalls wichtig für das Überleben der Zellen und die Bildung von Synapsen ist das Ansprechen auf Glutamat, welches ungefähr in der zweiten bis dritten Woche nach der Zellteilung beginnt (NMDA-Rezeptoren). Ungefähr nach sechs Wochen zeigen die neu entstandenen Zellen alle Eigenschaften eines reifen Neurons (Zhao et al. 2008). Die neuronale Reifung umfasst somit die Bildung von funktionellen Synapsen zu den korrespondierenden Strukturen der bestehenden neuronalen Netzwerke. Die spezifische Vernetzung und damit akkurate Integration der neuen Neurone ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Funktionalität von Neurogenese.

Bisher wurden hauptsächlich morphologisch-charakterisierende (van Praag et al. 2002, Jessberger et al. 2007) oder elektrophysiologische (Schmidt-Hieber et al. 2004, Laplagne et al. 2006, Toni et al. 2008) Studien zur Prüfung der Funktionalität neuer Neurone herangezogen. Eine weitere Möglichkeit ist die immunhistochemische Darstellung von immediate early genes (IEGs) (Carlén et al. 2002, Jessberger und Kempermann 2003, Kee et al. 2007, Tashiro et al. 2007). Immediate early genes sind Transkriptionsfaktoren, welche gebildet werden, wenn ein Neuron innerhalb eines neuronalen Schaltkreises aktiviert wird. Sie treten nach ihrer Translation in den Nukleus ein und regulieren die Transkription ihrer Ziel-Gene. IEGs benötigen keine de novo Proteinsynthese, sondern werden direkt via zelluläre Stimulation aktiviert: verschiedenste Signalkaskaden triggern eine schnelle Phosphorylierung, Dephosphorylierung oder Dimerisation, so dass ihre Induktion (und Deaktivierung) innerhalb von Minuten erfolgen kann (**Abb. 2**). So ist zum Beispiel nach Pláteník et al. (2000) für das Wachstum einer neuen Synapse Activator Protein 1 wichtig, welches entsteht nachdem c-fos und c-jun ein Heterodimer gebildet

haben. Die IEGs kommen im Rahmen der funktionellen Plastizität des adulten Gehirnes zum Tragen, indem sie aktivitätsabhängig synaptische Verbindungen in ihrer Stärke modulieren können. Ihr Nachweis wurde in der Vergangenheit genutzt, um neuronale Aktivität und damit Hirnfunktion darzustellen (Cole et al. 1989 und 1990, Aggleton und Brown 2005, Rakhade et al. 2007). Die transiente Expression der IEGs (**Abb. 2**) spiegelt eine Antwort des Netzwerkes auf ein bestimmtes Stimulationsparadigma wieder und erlaubt ein Beschreiben der an dieser Aufgabe beteiligten Zellen: IEG positive Zellen wurden durch eine spezifische Aufgabe aktiviert, die Expression kann deshalb als ein Marker für die Integration in bestehende funktionale Netzwerke gewertet werden.

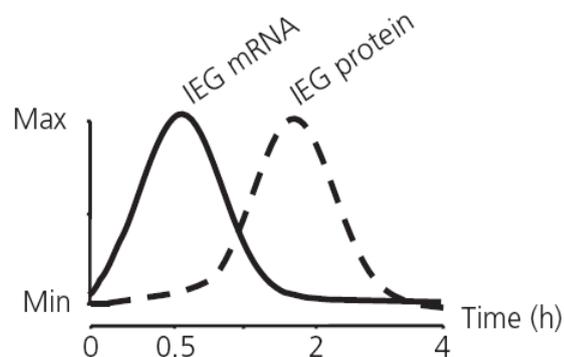


Abbildung 2: Zeitverlauf der transienten IEG Expression nach Stimulation (aus Kovács 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich das IEG c-fos verwendet. Für c-fos ist ein ausschließliches Vorkommen in reifen Neuronen einerseits, sowie ein differenziertes Expressionsmuster nach verschiedenen Lernaufgaben andererseits belegt (Review: Tischmeyer und Grimm 1999). Zur Stützung der Ergebnisse wurde Zif268 (auch Krox24 oder Egr-1) eingesetzt, dessen Fluoreszenzsignal in Neuronen jedoch von schwächerer Intensität ist und welches nach Schlaganfall auch in reaktiven Astrozyten exprimiert wird (Beck et al. 2008).

Unsere Arbeitsgruppe konnte in Übereinstimmung mit der Literatur zeigen, dass die Neurogenese im Gyrus dentatus durch die kortikal begrenzten Infarkte signifikant ansteigt (Kluska et al. 2005, Walter et al. 2010, Keiner et al. 2010). Untersuchungen zum Einfluss aktivitätsabhängiger Prozesse (**Abb. 3A**) nach fokaler Ischämie auf die Stammzellproliferation und Differenzierung zeigten eine Zunahme der

3. Ziele der Arbeit

Die Ziele der vorliegenden Studie waren wie folgt definiert:

1. Findet im Gyrus dentatus des Hippokampus nach fokaler Ischämie eine spezifische Aktivierung und damit eine funktionelle Integration von neu entstandenen Nervenzellen statt?
2. Haben aktivitätsabhängige Prozesse (rehabilitatives Training), wie reizreiche Umgebung und Laufradtraining, einen Einfluss auf die funktionelle Integration?
3. Werden die neuen Neurone aufgabenspezifisch genutzt? Werden sie bei einer kognitiven oder einer sensomotorischen Aufgabe aktiviert? Gibt es eine Abhängigkeit der Aufgabenspezifität vom zuvor durchgeführten Training?

Auf der Grundlage des gewählten Versuchsaufbaus konnten Vergleiche bezüglich Neurogenese und Leistung in Lernaufgaben, sowie hinsichtlich aktivierter/integrierter Neurone angestellt werden.

4. Methodik

Die Studie wurde an 35 adulten, männlichen C57BL/6J Mäusen durchgeführt. Die Tiere waren zum Start des Experiments zwischen 11 und 13 Wochen alt und wogen zwischen 20 und 30 g. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den EU-Richtlinien zum Schutz von Versuchstieren und mit Genehmigung des deutschen Ethikkomitee durchgeführt. Die Mäuse wurden in Käfigen der Maße 54 cm x 38 cm x 19 cm zu Gruppen von je 8 Tieren mit freiem Zugang zu Wasser und Futter in einem 14 h Licht / 10 h Dunkelheit Zyklus gehalten. Die Ausstattung der Käfige variierte entsprechend dem experimentellen Design.

4.1. Induktion der kortikalen Infarkte

Allen Tieren wurde ein photothrombotischer Infarkt im rechten sensomotorischen Vorderpfotenkortex gesetzt. Dabei wird der photosensible Farbstoff Bengalrosa injiziert und eine definierte cerebrale Region des intakten Schädels mit einer Kaltlichtquelle bestrahlt. An der lokal bestrahlten Stelle kommt es zu einer Bildung von freien Radikalen, was zu einer peroxidativen Schädigung der endothelialen Membran und damit letztendlich zu einer Thrombose des betroffenen Gefäßes führt. Es entstehen hierdurch in Größe und Lokalisation gut reproduzierbare Ischämien. Diese Methode zur Induktion der Infarkte wurde erstmals von Watson et al. (1985) an Ratten beschrieben, von Schroeter et al. (2002) für die Verwendung bei Mäusen angepasst und in unserer Arbeitsgruppe leicht modifiziert. Die Tiere erhielten zunächst eine Inhalationsnarkose mit 1,5 – 2,5 % Isofluran in einem Sauerstoff/Lachgas Gasmisch (20 % / 60 %). Die Schädelkalotte wurde freipräpariert und eine fiberoptische Kaltlichtquelle (KL 1500, Schott, Jena, Deutschland) mit 3200 Kelvin und einer Blendenöffnung von 1,8 mm wurde 1,0 mm anterior zum Bregma und 1,8 mm rechts der Mittellinie (entsprechend der Vorderpfotenregion, Paxinos 2001) direkt auf der Kalotte positioniert und für 15 min eingeschaltet (**Abb. 4**). Es wurden drei repetitive Injektionen mit je 0,1 ml Bengalrosa (10 mg/ml in 0,9 % NaCl; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit einem Intervall von 5 min intraperitoneal injiziert. Dabei wurde 5 min vor der Belichtung begonnen. Die Hautwunde wurde geklebt und die Tiere zum Erwachen

unter eine Rotlichtquelle gesetzt. Anschließend wurden sie direkt in die experimentellen Gruppen aufgeteilt.

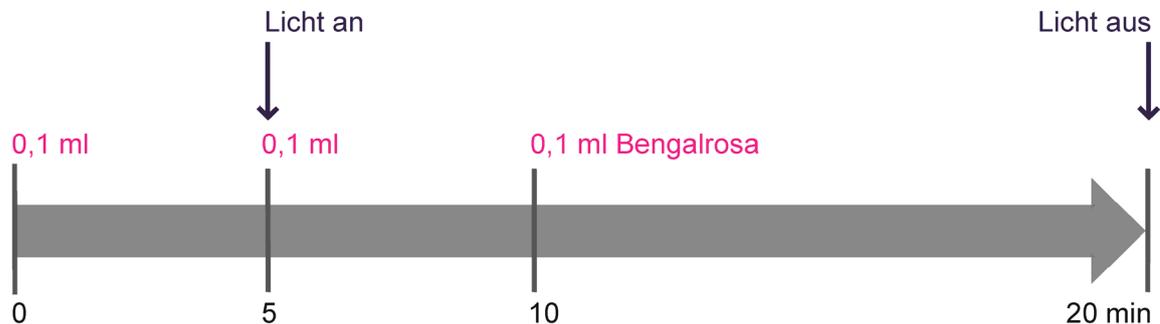


Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der Photothrombose. Es erfolgt die dreifache i.p. Injektion Bengalrosa. Die stereotaktische Beleuchtung erfolgt über 15 min, beginnend mit der zweiten Injektion Bengalrosa.

4.2. Experimentelles Design

Um die Integration nach cerebraler Ischämie neu entstandener Neurone zu untersuchen, wurde zunächst überprüft, ob es den neuen Neuronen überhaupt möglich ist auf einen Stimulus zu reagieren. Die proliferierenden Zellen wurden durch die 13-tägige intraperitoneale Applikation von zweimal täglich 50 mg/kg 5-Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU) markiert (**Abb. 5**). Um die neugeborenen Zellen innerhalb des kortiko-hippokampalen Netzwerks zu aktivieren, mussten die Tiere entweder das Morris Wasserlabyrinth (WM, $n = 17$ mit n gleich Anzahl der Tiere) als ‚kognitive‘ Aufgabe oder den Leiterlauf (LB, $n = 18$) als ‚sensomotorische‘ Aufgabe absolvieren. Die Aktivierung fand zweimal täglich von Tag 49 bis 56 postoperativ statt. Die Tiere wurden exakt 150 min nach Vollendung der letzten Aktivierung transkardial perfundiert (**Abb. 5**).

Um zu prüfen, ob sich die Aktivierbarkeit der neu generierten Neurone durch rehabilitatives Training beeinflussen lässt, wurden etablierte Mechanismen zur Steigerung der Neurogenese (Kempermann et al. 1997b, van Praag et al. 1999) genutzt. Eine Gruppe ($n = 12$, Reizreich, EE) wurde in eine reizreiche Umgebung mit zahlreichen farbigen Objekten wie Tunneln, Bällen, einem Haus und einem Laufrad transferiert. Die Anordnung der Objekte wurde jeden zweiten Tag verändert. Eine zweite Gruppe ($n = 11$, Laufrad, RW) erhielt zwei Laufräder. Eine dritte Gruppe ($n = 12$, Standard, ST) wurde unter Standardbedingungen als Kontrollgruppe

gehalten (**Abb. 5**). Die Trainingsperiode startete unmittelbar postoperativ und währte bis zum 42. postoperativen Tag. Danach wurden alle Tiere für die Restdauer des Experiments in Standardkäfige transferiert, um Interferenzen durch die Trainingsbedingungen während der Aktivierung zu vermeiden. Nach einer Woche Ruhephase (ab Tag 49 postoperativ) wurden alle Gruppen weiter aufgeteilt und erhielten zur aktivitätsabhängigen Stimulation der IEGs entweder das Wasserlabyrinth nach Morris (WM) oder den Leiterlauf (LB) (**Abb. 5**).

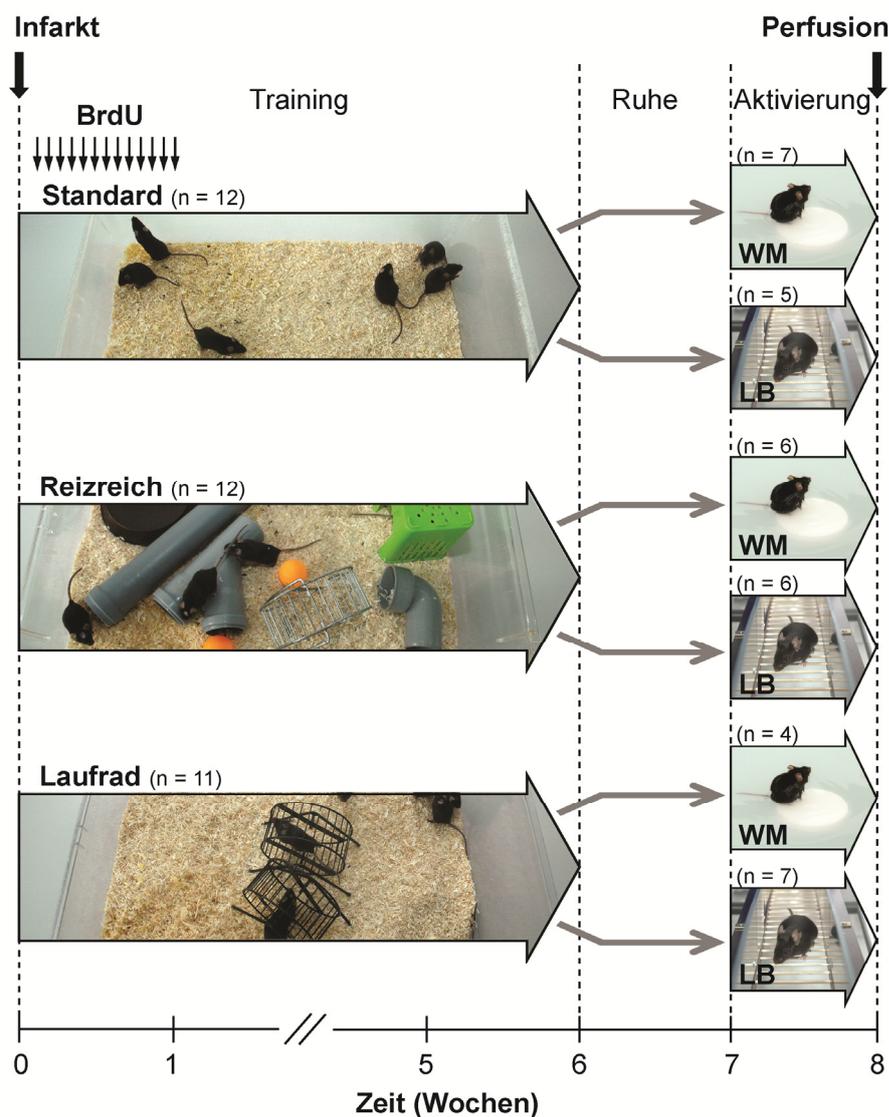


Abbildung 5: Experimentelles Design. Nach Infarktinduktion wurden die Tiere für sechs Wochen in die verschiedenen Experimentalgruppen aufgeteilt (Trainingsphase). Es folgte eine einwöchige Ruhephase im Standardkäfig für alle Tiere. Danach wurde aus jeder Haltungsbedingung die Hälfte der Tiere dem Wasserlabyrinth und die anderen dem Leiterlauf zugeführt.

4.3. Wasserlabyrinth nach Morris

Der Durchmesser des Wasserbeckens betrug 120 cm. Es wurde bis zu einer Höhe von 20 cm mit Wasser gefüllt, welches auf $20 \pm 1^\circ\text{C}$ temperiert und mit nichttoxischer Farbe weiß gefärbt wurde. Eine Plattform war 1 cm unter der Wasseroberfläche in der Mitte des nordöstlichen Quadranten positioniert. Zur Orientierung der Tiere wurden an den Wänden des Raumes und am Beckenrand große Markierungen angebracht, sowie der Raum unregelmäßig ausgeleuchtet. Eine Sitzung beinhaltete vier Einzeltests und wurde zweimal täglich durchgeführt. Die Startpositionen variierten in jedem Einzeltest. Jeder Test dauerte entweder bis die Maus die verborgene Plattform fand oder längstens 60 s. In letzterem Fall wurde die Maus nach Ablauf der 60 s vorsichtig manuell zur Plattform gelenkt. Jedes Tier durfte sich nach jedem Einzeltest für 30 s auf der Plattform ausruhen und orientieren. Vor dem allerersten Test am ersten Tag durfte jedes Tier 10 s auf der Plattform verweilen. Am letzten Tag der Aktivierungsperiode wurde der Test ohne Plattform und mit einer Schwimmdauer von 60 s durchgeführt. Der Startpunkt lag dabei gegenüber der ehemaligen Plattformposition. Nach jeder Sitzung wurden die Tiere sanft abgetrocknet und unter einer Rotlichtlampe gewärmt. Die Zeit zum Erreichen der Plattform, der Schwimmpfad und die Schwimgeschwindigkeit wurden mittels der Etho Vision[®] Software (Noldus Information Technology, Wageningen, Niederlande) aufgezeichnet. Die Lernleistung der Tiere wurde als Differenz der Latenz von Tag 1 zu Tag 7 berechnet. Die Zielzone wurde als ein 30 cm durchmessender Kreis um den Mittelpunkt der ehemaligen Plattformposition definiert.

4.4. Leiterlauf

Eine hölzerne Leiter von 1 m Länge, einer Breite von 6 cm und regelmäßigen Sprossenabständen von 2 cm wurde waagrecht in einer Höhe von 20 cm und mit einem Endpunkt im Heimatkäfig der Mäuse platziert (**Abb. 6**). Analog zum WM fanden zwei Sitzungen pro Tag mit jeweils vier Läufen (3 / 2 / 3 / 2 Läufe) statt. Es wurde kein abschließender Testlauf durchgeführt.

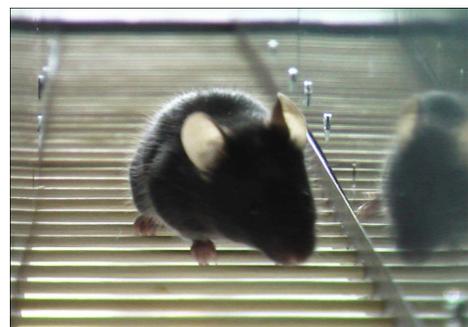


Abbildung 6: Leiterlauf.

4.5. Gewebeaufarbeitung

Die Tiere wurden mit Diethylether tief anästhesiert und mit 4 %-iger phosphatgepufferter Paraformaldehydlösung (PFA, pH 7,4) transkardial perfundiert. Die Gehirne wurden direkt nach der Perfusion freipräpariert, entnommen und in 4 %-iger PFA-Lösung über Nacht nachfixiert. Anschließend wurden sie für 24 h in 10 %-iger phosphatgepufferter Saccharoselösung und für mindestens weitere 24 h (bis die Gehirne gesunken waren) in 30 %-iger phosphatgepufferter Saccharoselösung kryoprotectiert. Danach wurden die Gehirne bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Methylbutan tiefgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Sequentielle Koronarschnitte mit einer Dicke von $40\text{ }\mu\text{m}$ wurden am Gefriermikrotom (Leica, Wetzlar, Deutschland) angefertigt und die entstanden Schnitte zur weiteren Verarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in phosphatgepufferter Anti-Gefrierlösung aufbewahrt.

4.6. Infarktvolumentrie

Zur Volumetrie wurde über das gesamte Gehirn gemessen. Jeder sechste Schnitt der Infarktregion, sowie jeder zwölfte Schnitt der gesamten rostro-kaudalen Ausdehnung (beginnend bei $-0,9\text{ mm}$ posterior zum Bregma, entsprechend Paxinos 2001), wurde mit 5 %-iger Gelatinelösung auf Objektträger aufgezogen, mit Kresylviolett bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 7 min gefärbt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe ($70\text{ }\% / 70\text{ }\% / 96\text{ }\% / 96\text{ }\% / 100\text{ }\% / 100\text{ }\%$) entwässert, mit Xylol fixiert und mit Toluol eingedeckt. Die Fläche sowohl des Infarktes als auch des gesamten Gehirnes wurde mit Hilfe einer CCD Kamera (Panasonic, Hamburg, Deutschland) und der National Institutes of Health Image Software (Bethesda, Maryland, USA) vermessen. Die Volumina wurden durch Addition der Einzelflächen und Multiplikation mit der entsprechenden Schnittintervalldicke ($240\text{ }\mu\text{m}$ für die Infarktregion, $480\text{ }\mu\text{m}$ ab Bregma $-0,9\text{ mm}$) berechnet. Resultierende Volumina sind in mm^3 angegeben.

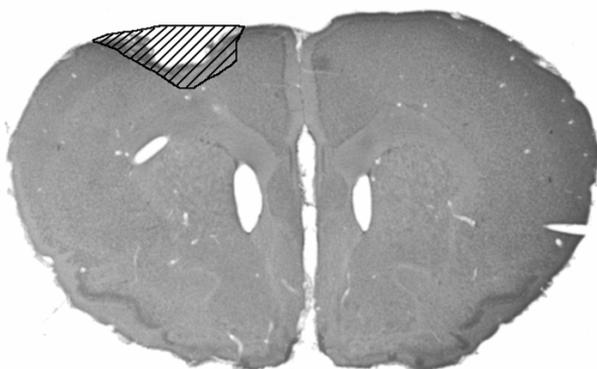


Abbildung 7: Kresylviolett-Färbung zur Darstellung des Infarkt volumens (schraffiert). Koronare Schnitt ebene bei Bregma $0,86\text{ mm}$ nach Paxinos 2001.

4.7. Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Färbung wurde die Peroxidasetechnik angewandt. Jeder sechste Schnitt über der Hippokampusregion wurde für 30 min in 0,6 % Wasserstoffperoxid in Trisgepufferter Salzlösung (TBS) zur Blockierung der endogenen Peroxidasen inkubiert, gewaschen, 30 min in 2 N Salzsäure denaturiert, 10 min in 0,1 M Borsäure inkubiert, mit TBS gewaschen und schließlich für 30 min in TBS-Plus (3 % Donkey Serum und 0,1 % Triton in TBS) geblockt. Es erfolgte anschließend die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4 °C über Nacht. Die Schnitte wurden nach dem Waschen mit TBS und neuerlichem Blockieren in TBS-Plus mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBS erfolgte die 60 minütige Inkubation in ABC-Reagenz (Avidin Dehydrogenase / biotinylierte Peroxidase; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Der letzte Reaktionsschritt wurde durch die Verwendung von HistoGreen (Linaris, Wertheim, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben visualisiert. Die Reaktionszeit für die BrdU Färbung betrug 4 min, für c-fos 5 min. Die Schnitte wurden sorgfältig gewaschen, mit 5 %-iger Gelatinelösung auf Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Danach wurden sie in einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe (50 % / 80 % / 100%) für je 2 min entwässert. Anschließend wurden sie in Xylol fixiert und im letzten Schritt in Toluol eingedeckt.

Antikörper	Firma	Verdünnung
<i>primäre Antikörper</i>		
Rat anti BrdU	AbD Serotec, Martinsried, Deutschland	1:500
Rabbit anti c-fos	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	1:500
<i>sekundäre Antikörper</i>		
Biotin-conjugated Donkey anti rat IgG	Jackson Laboratory, Maine, USA	1:500
Biotin-conjugated Donkey anti rabbit IgG	Jackson Laboratory, Maine, USA	1:500

Tabelle 1: Antikörper für Immunhistochemie / Peroxidasetechnik.

4.8. Immunfluoreszenz

Zur Bestimmung der Aktivität der neu gebildeten Nervenzellen wurden Dreifach-Immunfluoreszenz Färbungen mit Antikörper gegen den Proliferationsmarker BrdU, den neuronalen Marker NeuN (neuronal nuclei) und jeweils einen der Aktivitätsmarker (IEGs) c-fos oder Zif268 durchgeführt. Dazu wurde jeder zwölfte Schnitt über der Hippokampusregion verwendet und ausgewertet. Diese wurden mit 2 N Salzsäure für 30 min denaturiert und 10 min in 0,1 M Borsäure inkubiert. Die Schnitte wurden mit TBS gewaschen und dann 30 min in TBS-Plus geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den drei primären Antikörpern (gegen BrdU, NeuN und ein IEG) bei 4 °C für 24 h. Nach dem erneuten Waschen mit TBS und dem 30 minütigen Blocken mit TBS-Plus erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden sekundären Antikörpern für weitere 24 h bei 4 °C. Danach wurden die Schnitte sorgfältig gewaschen, mit 5 % Gelatine aufgezogen, luftgetrocknet und mit wasserlöslichem Eindeckmedium (Mowiol) eingedeckt.

Antikörper	Firma	Verdünnung
<i>primäre Antikörper</i>		
Rat anti BrdU	AbD Serotec, Martinsried, Deutschland	1:500
Mouse anti NeuN	Millipore, MA, USA	1:500
Rabbit anti c-fos	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	1:250
Rabbit anti Zif268	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	1:250
<i>sekundäre Antikörper</i>		
Rhodamine Donkey anti rat	Jackson Laboratory, Maine, USA	1:500
cy5 Donkey anti mouse	Jackson Laboratory, Maine, USA	1:500
Alexa fluor 488 anti rabbit	Invitrogen, CA, USA	1:500

Tabelle 2: Antikörper für Immunfluoreszenz.

4.9. Quantifizierung und konfokale Lasermikroskopie

Die Auswertung der immunhistologischen Färbungen durch Quantifizierung der BrdU und c-fos positiven Zellen erfolgte am Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Germany) mit einem 40x-Objektiv. Die BrdU bzw. c-fos positiven Zellen wurden auf jedem gefärbten Schnitt innerhalb des gesamten ipsi- und kontralateralen Gyrus dentatus (DG) separat für Körnerzellschicht (GCL) und Subgranularzone (SGZ) ausgezählt. Die SGZ wurde als zweizellige dünne Schicht des Gyrus dentatus, angrenzend an den Hilus, definiert. Zur Hochrechnung der Zellzahlen wurde die Intervallschnittdicke herangezogen (240 µm). In Einklang mit früheren Studien (Jin et al. 2001, Wurm et al. 2007, Walter et al. 2010) konnte eine beidseitige Stimulation der BrdU Aufnahme nach einseitigem Hirninfarkt ohne statistische Unterschiede zwischen ipsi- und kontralateralen Zellzahlen dokumentiert werden. Deshalb wurden ipsi- und kontralaterale Daten zusammengefasst. Die Fluoreszenzfärbungen wurden am konfokalen Lasermikroskop (LSM 710, Carl Zeiss Jena, Deutschland) ausgewertet. Zur Visualisierung der Fluoreszenzfarbstoffe wurde ein DPSS 561-10 Laser (für Rhodamin) sequentiell zu den parallel geschalteten Lasern Argon 488 (für Alexa flour 488) und He-Ne 633 (für Cy 5) genutzt. Diese Schaltung wurde gewählt, um bei bester Zeitoptimierung Extinktions- oder Emissionsüberlappungen zu vermeiden. Um die Neurogenese zu bestimmen, wurden 45 ± 5 BrdU positive Zellen beider Hippokampi anhand ihrer Kolo-kalisation mit NeuN phänotypisiert. Die Anzahl der neuen Neurone wurde dann durch Multiplikation des Prozentsatzes BrdU+ NeuN+ Zellen mit der absoluten Zahl der BrdU+ Zellen berechnet. Um die Anzahl der IEG exprimierenden (c-fos oder Zif268) neuen Neurone zu evaluieren wurde der komplette DG mit einem 20x-Objektiv in seiner kompletten Tiefe via z-stack gescannt. Im Falle einer möglichen Dreifachmarkierung wurde ein ergänzender z-stack mit einem 40x-Objektiv durchgeführt. Lediglich Zellen, welche eine klare nukleäre Kolo-kalisation aller drei Marker aufwiesen, wurden als positiv gewertet. Gezählt wurde beidseitig, getrennt ausgewertet nach SGZ und GCL. Die Hochrechnung der Zellzahlen erfolgte auf Grundlage der Intervallschnittdicke von 480 µm. Alle Zellzählungen wurden für die experimentellen Gruppen verblindet durchgeführt.

4.10. Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die Erhebung der statistischen Daten erfolgte mittels der Software SPSS[®] Version 16 (IBM, NY, USA). Zunächst wurde auf Normalverteilung mittels Shapiro Wilk getestet und zur Erueierung globaler Effekte eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Daraus resultierend (bei $p < 0,05$) wurden Paartests angeschlossen. Bei parametrischer Datenverteilung (BrdU-positive Zellen und BrdU-positive Neurone) wurde für die statistische Analyse ein Zweistichproben-T-Test genutzt. Zur Prüfung nicht-parametrischer Daten wurde die exakte Signifikanz des Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse bei $p < 0,05$ angenommen.

5. Ergebnisse

Alle Mäuse erholten sich schnell von der Operation und zeigten kein Verlust des Körpergewichtes oder auffällige Verhaltensänderungen. Die reizreich gehaltenen Tiere erkundeten ihre Umgebung und die Objekte aktiv, die Läufer nutzen die angebotenen Laufräder hochfrequent, Geschwindigkeit oder zurückgelegte Distanz wurde jedoch nicht bestimmt. Alle ausgewerteten Tiere wiesen kleine kortikale Infarkte ohne Affektion der weißen Substanz auf. Das Infarktvolumen unterschied sich in den einzelnen Experimentalgruppen nicht:

Gruppe	Infarktvolumen
Standard WM	0,65 ± 0,11
Standard LB	0,74 ± 0,06
Reizreich WM	0,87 ± 0,21
Reizreich LB	0,57 ± 0,10
Laufrad WM	0,73 ± 0,11
Laufrad LB	0,84 ± 0,08

Tabelle 3: Infarktvolumentrie. Angabe der Volumina in mm³. WM = Wasserlabyrinth, LB = Leiterlauf

5.1. Neu generierte Neurone reagieren auf Aktivierungsaufgaben

Zwei Monate nach photochemisch induziertem Hirninfarkt führten beide Aktivierungsparadigmen zur neuronalen Expression des IEGs c-fos in allen Tieren. Die Expression zeigte sich vor allem im Gyrus dentatus (**Abb. 8A**), zudem jedoch auch im enterorhinalen Kortex und mit einem schwächeren Fluoreszenzsignal auch im gesamten Kortex. Zellen, welche in der Immunfluoreszenz eine eindeutige Kollokalisierung aller drei Marker (dem Proliferationsmarker BrdU, dem neuronalen Marker NeuN und dem aktivitätsabhängigen IEG c-fos) aufwiesen, wurden als aktivierte, neu generierte, reife Neurone gewertet (**Abb. 8B**). Diese kamen in allen Experimentalgruppen und in nahezu allen Tieren (n = 28), sowohl in der Subgranularzone (SGZ), als auch in der Körnerzellschicht (GCL) vor.

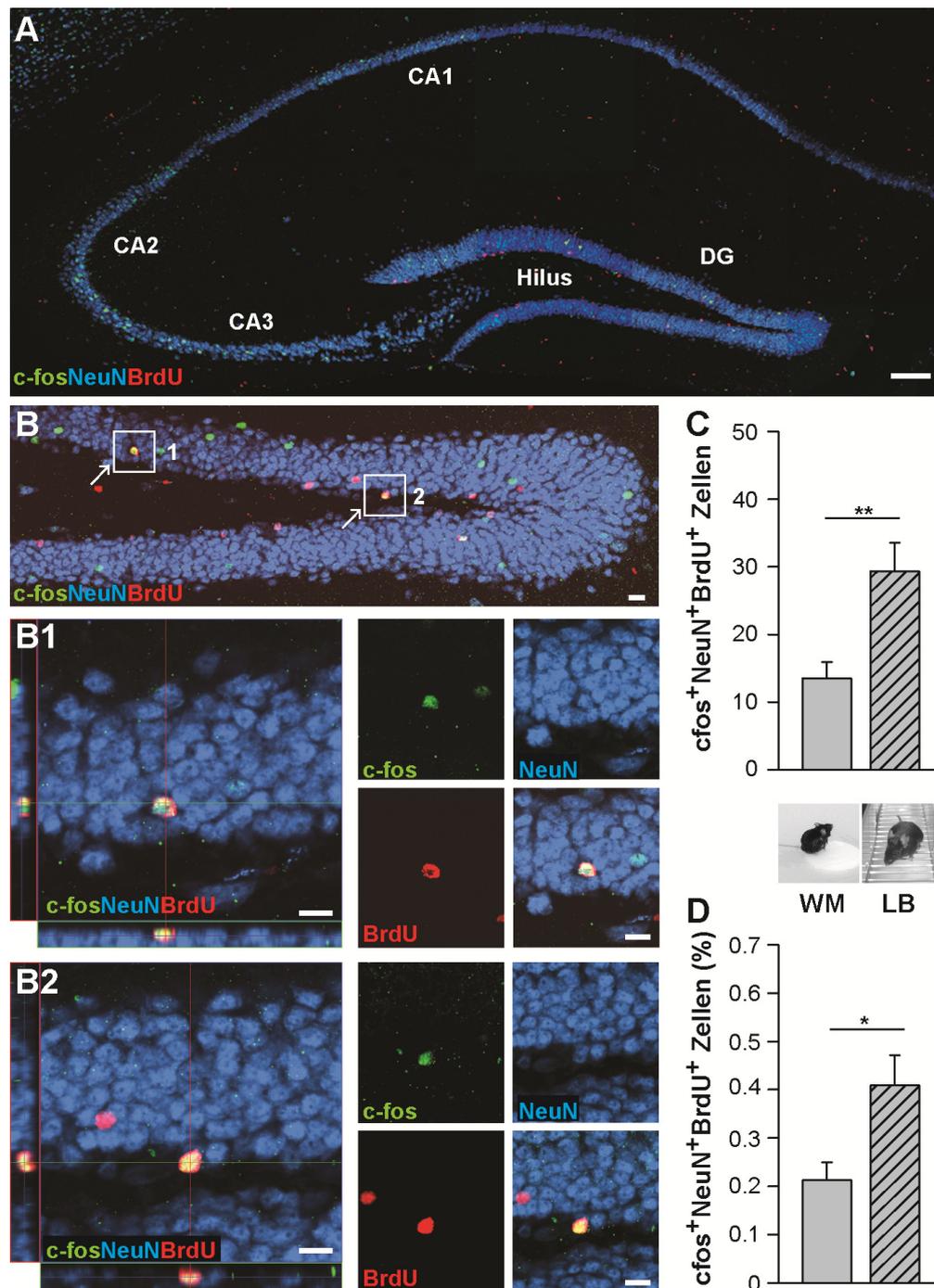


Abbildung 8: Expression des IEGs c-fos nach verschiedenen Aktivierungsparadigmen. (A) Konfokales Übersichtsbild über den gesamten Hippokampus (Maßstab 100 µm), mit dem Gyrus dentatus (DG), dem Hilus und der Ammonshornformation (CA1-3). Zu beachten ist die grundsätzlich selektive und spärliche Expression von c-fos. (B) Detailaufnahme des DG (Maßstab 20 µm). (B1, B2) Höhere Vergrößerung der mit Kästen markierten Zellen aus B, welche eine klare Kolokalisation der drei Marker aufweisen (Maßstab 10 µm). (C) Signifikante Erhöhung der aktivierten neuen Nervenzellen nach Leiterlauf (LB; ** p = 0,005). (D) Ebenso signifikante Steigerung des Prozentsatzes der aktivierten neuen Neurone nach Leiterlauf (LB; * p = 0,05).

Die Quantifizierung der dreifach markierten Zellen ergab 14 ± 2 aktivierte neue Neurone nach Absolvierung des Morris Wasserlabyrinth und 29 ± 4 Zellen nach der Leiterlaufaktivierung, unabhängig von den Trainingsbedingungen (**Abb. 8C**). Dieser Unterschied mit deutlich erhöhter Zellzahl nach Leiterlauf war statistisch signifikant ($p = 0,003$). In Prozent betrug die Anzahl aktivierter neuer Neurone nach LB $0,41 \pm 0,06$ % im Vergleich zu $0,21 \pm 0,04$ % nach dem WM ($p = 0,012$; **Abb. 8D**).

5.2. Generelle Aktivierung des Gyrus dentatus

Die Quantifizierung der c-fos positiven Zellen im DG mittels Peroxidasetechnik offenbarte interessanterweise eine deutliche Abhängigkeit der Aktivierung vom jeweils verwendeten Aktivierungsparadigma mit signifikant stärkerer Aktivierung nach Leiterlauf (**Tab. 4**). Tiere, welche zuvor ein rehabilitatives Training in Form der reizreichen Umgebung angeboten bekommen hatten, zeigten bei jeweils entsprechendem Aktivierungsparadigma eine signifikant geringere Aktivierung von Körnerzellen im Vergleich zu Tieren nach Laufradtraining und Kontrolltieren. Der Anteil stimulierter Körnerzellen an der Gesamtheit der Körnerzellen wurde anhand der in der Literatur beschriebenen Neuronenzahl für C57BL/6 Mäuse geschätzt ($2,39 \times 10^5 \pm 0,25 \times 10^5$ Neurone; Kempermann et al. 1997a) und betrug 1 - 2 % (**Tab. 4**). Hierbei wurde aufgrund der Schätzung keine statistische Analyse durchgeführt.

Gruppe	c-fos+	c-fos+/ DG Neurone
Standard WM	3104 ± 442	$1,3 \pm 0,2$ %
Standard LB	5709 ± 602 ** **	$2,4 \pm 0,3$ %
Reizreich WM	2249 ± 213	$0,9 \pm 0,1$ %
Reizreich LB	3338 ± 151 **	$1,4 \pm 0,1$ %
Laufrad WM	3564 ± 403 +	$1,5 \pm 0,2$ %
Laufrad LB	5734 ± 374 ** **	$2,4 \pm 0,2$ %

Tabelle 4: Quantifizierung der c-fos Immunhistochemie (** $p < 0,005$, MWU-Test, jeweils gegenüber WM bei gleichen Trainingsbedingungen; + $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, MWU-Test, jeweils gegenüber Reizreich bei gleichem Aktivierungsparadigma).

5.3. Trainingseffekte auf die Neurogenese und Lernleistung

Sowohl die reizreiche Umgebung, wie auch das Laufradtraining steigerten die Neurogenese signifikant (**Tab. 5, Abb. 9A**). Die Zahl der BrdU-positiven Neurone stieg von 4645 ± 310 in Kontrolltieren auf 7279 ± 591 nach reizreicher Umgebung ($p < 0,001$), und auf 8858 ± 659 nach Laufradtraining ($p < 0,001$). Der Prozentsatz der BrdU-positiven Neurone pro BrdU-positiver Zellen variierte nicht und lag bei 82,4 - 84,7 % (**Tab. 5**).

Gruppe	BrdU+	BrdU+NeuN+	BrdU+NeuN+ / BrdU+
Standard	5491 ± 370	4645 ± 310	$84,7 \% \pm 0,9 \%$
Reizreich	$8834 \pm 610^{**}$	$7279 \pm 591^{**}$	$82,4 \% \pm 1,0 \%$
Laufrad	$10438 \pm 703^{**}$	$8858 \pm 659^{**}$	$84,6 \% \pm 1,2 \%$

Tabelle 5: Quantifizierung der BrdU-Immunhistochemie; ** $p < 0,001$, T-Test, gegenüber Standard.

Die Analyse der Verhaltensdaten zur hippokampalen Funktion im Wasserlabyrinth zeigte bei Tieren aus der reizreichen Umgebung einen flacheren Verlauf der Lernkurve im Vergleich zu den Standardtieren (**Abb. 9B**). Dabei wurde keine statistische Signifikanz erreicht, jedoch kann dies als Tendenz einer besseren Performanz nach dieser Form des rehabilitativen Trainings gewertet werden. Tiere mit absolviertem Laufradtraining zeigten eine bessere Lernleistung im Vergleich zu den Kontrolltieren ($p = 0,006$), was visuell auch an einer steileren Lernkurve zu erkennen ist. Jedoch muss hierbei berücksichtigt werden, dass die Läufer einen schlechteren Ausgangswert hatten. Eigenartigerweise schnitten Tiere mit absolviertem Laufradtraining schlechter im Testlauf des Wasserlabyrinths ab: sie verweilten weniger lange in der 30-cm-Zielzone, wenn auch ohne statistische Signifikanz (**Abb. 9B**). Zudem zeigten sie eine niedrigere Schwimmgeschwindigkeit. Eine geschwindigkeitskorrigierte Analyse veränderte die generellen Tendenzen des Verhaltens der Läufer jedoch nicht.

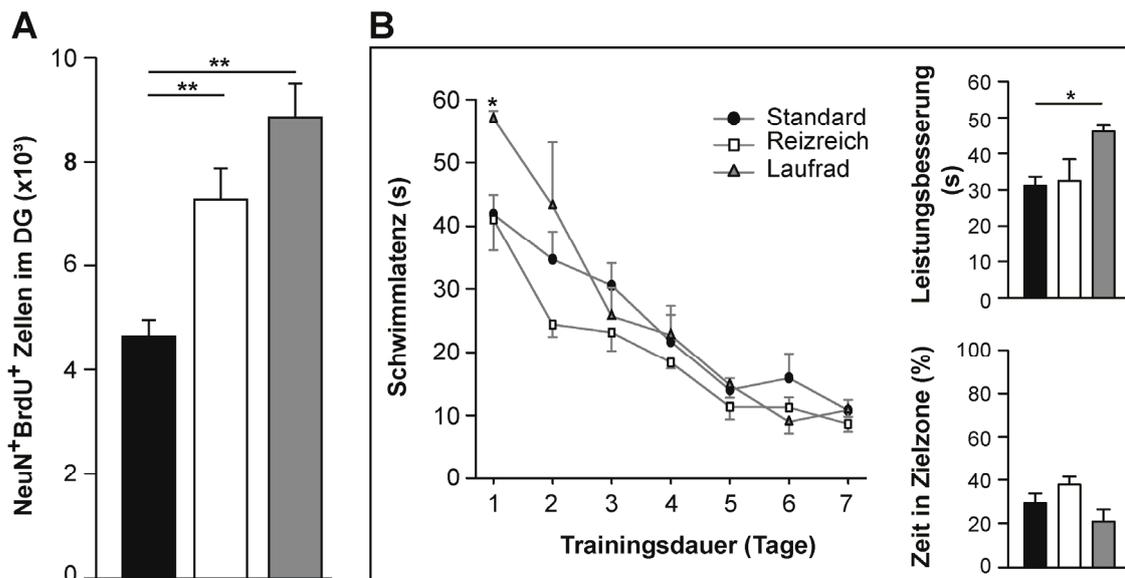


Abbildung 9: Trainingseffekte auf Neurogenese und Wasserlabyrinth. (A) Reizreiche Umgebung und Laufrad erhöhen signifikant die Neurogenese im Gyrus dentatus (DG; ** $p < 0,001$, T-Test). (B) Die Abnahme der Latenz über die Dauer des Trainings zeigt den Lerneffekt aller Tiere an. Zu beachten ist der niedrigere Verlauf der Lernkurve der reizreich gehaltenen Tiere unterhalb der Standard Lernkurve, sowie der steilere Verlauf der Laufradtiere im Vergleich zur Standardgruppe, mit Schneidung der Kurven der anderen beiden Gruppen. Das obere Histogramm visualisiert die Lernleistung als Differenz von Tag 1 zu Tag 7. Das untere Histogramm zeigt die Aufenthaltsdauer der Tiere in der 30-cm-Zielzone im Testlauf an Tag 8 (* $p < 0,05$, MWU-Test).

5.4. Postischämisches Training beeinflusst Aktivierbarkeit nicht

Um die Frage zu beantworten, ob die Exposition in einer reizreichen Umgebung oder das Laufradtraining die Ansprechbarkeit der neuen Neurone steigern kann, wurde der Anteil der c-fos positiven neugeborenen Neurone an der Gesamtheit der neuen Neurone berechnet und die zwei verschiedenen Trainingsgruppen gegenüber den Standardkontrollen verglichen (**Tab. 6, Abb. 10A**). Bei dieser Gegenüberstellung zeigte sich als auffälligster Unterschied wiederum die höhere Aktivierung nach dem Leiterlauf im Vergleich zum Wasserlabyrinth in allen korrespondierenden Gruppen. Dahingegen steigerte weder die Exposition in einer reizreichen Umgebung, noch das Laufradtraining den Anteil aktivierter neuer Neurone (**Tab. 6, Abb. 10A**). Interessanterweise war der Anteil aktivierter neuer Neurone bei Tieren aus der reizreichen Umgebung sogar tendenziell niedriger (unabhängig vom verwendeten Aktivierungsparadigma) als bei den Standardkontrollen. Auch die Absolutzahl der aktivierten neuen Neurone zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den

Trainings- und den Standardgruppen (**Tab. 6, Abb. 10B**). Der Anstieg der Aktivierung nach Leiterlauf im Vergleich zum Wasserlabyrinth war für die Laufradgruppe signifikant ($p = 0,042$). Zusammenfassend führten weder eine reizreiche Umgebung noch Laufradtraining zu einem Anstieg der Aktivierung von nach Schlaganfall neu entstandenen Neuronen.

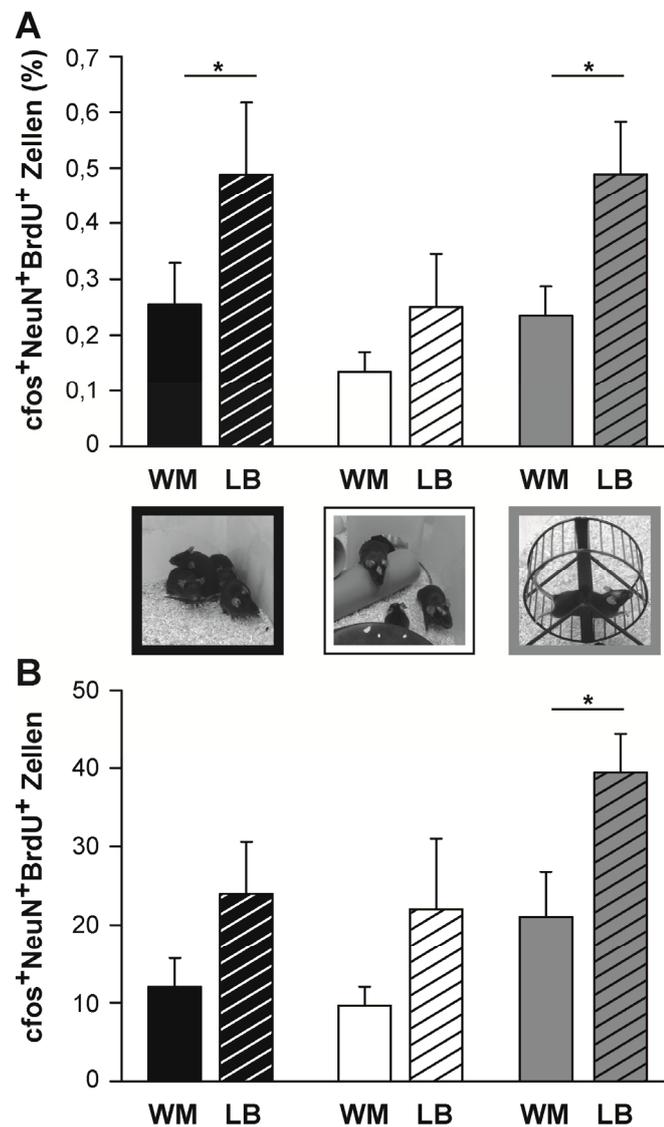


Abbildung 10: Trainingseffekte auf aktivierte neue Neurone. Anteil (A) und Absolutzahl (B) der c-fos positiven Neurone in den verschiedenen Trainingsgruppen im gesamten Gyrus dentatus. Die Trainingsformen sind schwarz (Standard), weiß (Reizreich) und grau (Laufrad) gefärbt und korrespondieren zu den Symbolen. Ausgefüllte Balken zeigen die Wasserlabyrinthaktivierung an, gestreifte Balken Tiere aus dem Leiterlaufparadigma. Auffallend sind der höhere Anteil (A) und die höhere Absolutzahl (B) c-fos positiver Neurone nach Leiterlauf in allen Subgruppen. Jedoch ist keine statistische Signifikanz durch die Veränderung der Trainingsformen induzierbar (* $p < 0,05$, MWU-Test).

Gruppe	c-fos+BrdU+NeuN+	c-fos+BrdU+NeuN+ / BrdU+NeuN+
Standard WM	12,0 ± 3,7	0,25 ± 0,07 %
Standard LB	24 ± 6,5 *	0,49 ± 0,13 %
Reizreich WM	9,6 ± 2,4	0,13 ± 0,03 %
Reizreich LB	22,0 ± 9,0	0,25 ± 0,09 %
Lauftrad WM	21,0 ± 5,7	0,24 ± 0,05 %
Lauftrad LB	39,4 ± 5,0 *	0,49 ± 0,09 % *

Tabelle 6: Quantifizierung der Dreifach-Immunfluoreszenz; * $p < 0,05$, MWU-Test, jeweils gegenüber der Wasserlabyrinthaktivierung (WM) bei gleichen Trainingsbedingungen.

5.5. Kognitive Aktivierung stimuliert vorwiegend neue Neurone der GCL

Ein Großteil der neu gebildeten Neurone (BrdU+ NeuN+) war in der Subgranularzone (SGZ) lokalisiert, und nur rund 20 - 30 % dieser Neurone migrierten in die Körnerzellschicht (GCL, **Abb. 11A, B**). Lauftradtraining erhöhte diesen Anteil signifikant, und zwar sowohl im Vergleich zu den Standardkontrollen ($p = 0,001$), wie auch zur reizreichen Umgebung ($p = 0,006$). Die Analyse der laminären Lokalisation der c-fos positiven Neurone zeigte unterschiedliche Verteilungsmuster in Abhängigkeit von den Aktivierungsparadigmen und des vorausgegangenen Trainings. Interessanterweise zeigten Tiere nach der kognitiven Aktivierung durch das Wasserlabyrinth einen signifikant hohen Anteil von rund 70 % aktivierter neuer Neurone in der Körnerzellschicht wenn sie zuvor rehabilitatives Training absolviert hatten (**Abb. 11C**). Nach reizreicher Umgebung entsprach der Anteil $75,0 \pm 25,0$ % und nach Lauftradtraining $66,7 \pm 23,6$ % im Vergleich zu 10 ± 10 % dreifachmarkierter Zellen bei untrainierten Tieren. Die vor allem sensomotorische Leiterlaufaufgabe dahingegen führte zu einer relativ unspezifischen und gleichmäßigen Aktivierung neuer Neurone aus beiden Schichten des Gyrus dentatus. Das Training hatte hierbei keinerlei Einfluss auf das Verteilungsmuster (**Abb. 11D**).

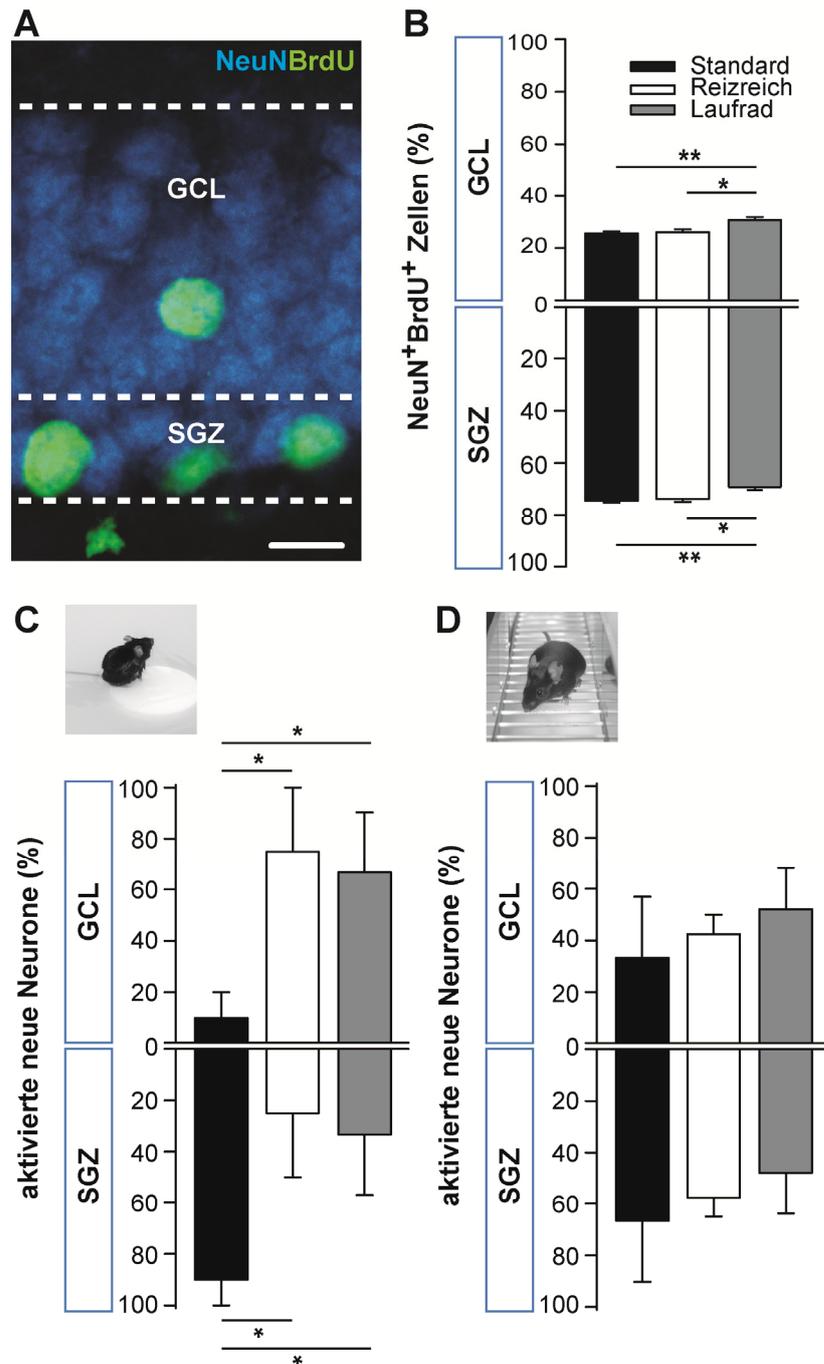


Abbildung 11: Laminäre Lokalisation aller neuen Neurone, sowie der aktivierten neuen Neurone. (A) Konfokales Bild zur Definition von Subgranularzone (SGZ) und Körnerzellschicht (GCL, Maßstab 10 µm). (B) Verteilung der neugeborenen Neurone in Abhängigkeit vom Trainingsstatus (** p < 0,005, * p < 0,05, T-Test). (C, D) Die beiden Histogramme zeigen die Verteilung aktivierter neuer Neurone in Abhängigkeit vom Trainingsstatus. Nach Aktivierung im Wasserlabyrinth (C) war der Anteil dieser Zellen in der GCL beider Trainingsgruppen signifikant gegenüber den Standardkontrollen erhöht (* p < 0,05, MWU-Test). Nach Leiterlaufaktivierung (D) zeigte sich keine veränderte Verteilung in Abhängigkeit vom Training.

5.6. Stärkere Zif268 Expression nach beiden Aktivierungsaufgaben

Um die erhaltenen Ergebnisse zu validieren, wurde die Expression eines weiteren IEG (Zif268) in den neu generierten Neuronen untersucht. Exemplarisch wurden hierfür die Tiere der Laufradgruppen aufgearbeitet. Schon im Überblick variierte das Expressionsmuster von Zif268 insofern von dem von c-fos, als das zum Beispiel innerhalb der Ammonshornformation (CA) reichlich Zif268 exprimiert wurde, wohingegen im Gyrus dentatus eine geringe Aktivität zu verzeichnen war (**Abb. 12A**). Nichts desto trotz ließen sich in allen Tieren (n = 8) Zif268 positive neue Neurone (**Abb. 12B, C**) nachweisen und zwar in einer etwa 4-fach höheren Anzahl als c-fos positive Neurone. In Übereinstimmung mit unseren vorherigen Befunden waren die Anzahl und der Anteil der aktivierten neuen Neurone nach Leiterlauf (84 ± 9 Zellen bzw. 0.96 ± 0.07 %) im Vergleich zum Wasserlabyrinth (162 ± 30 Zellen bzw. 2.06 ± 0.54 %) signifikant erhöht (**Abb. 12D, E**).

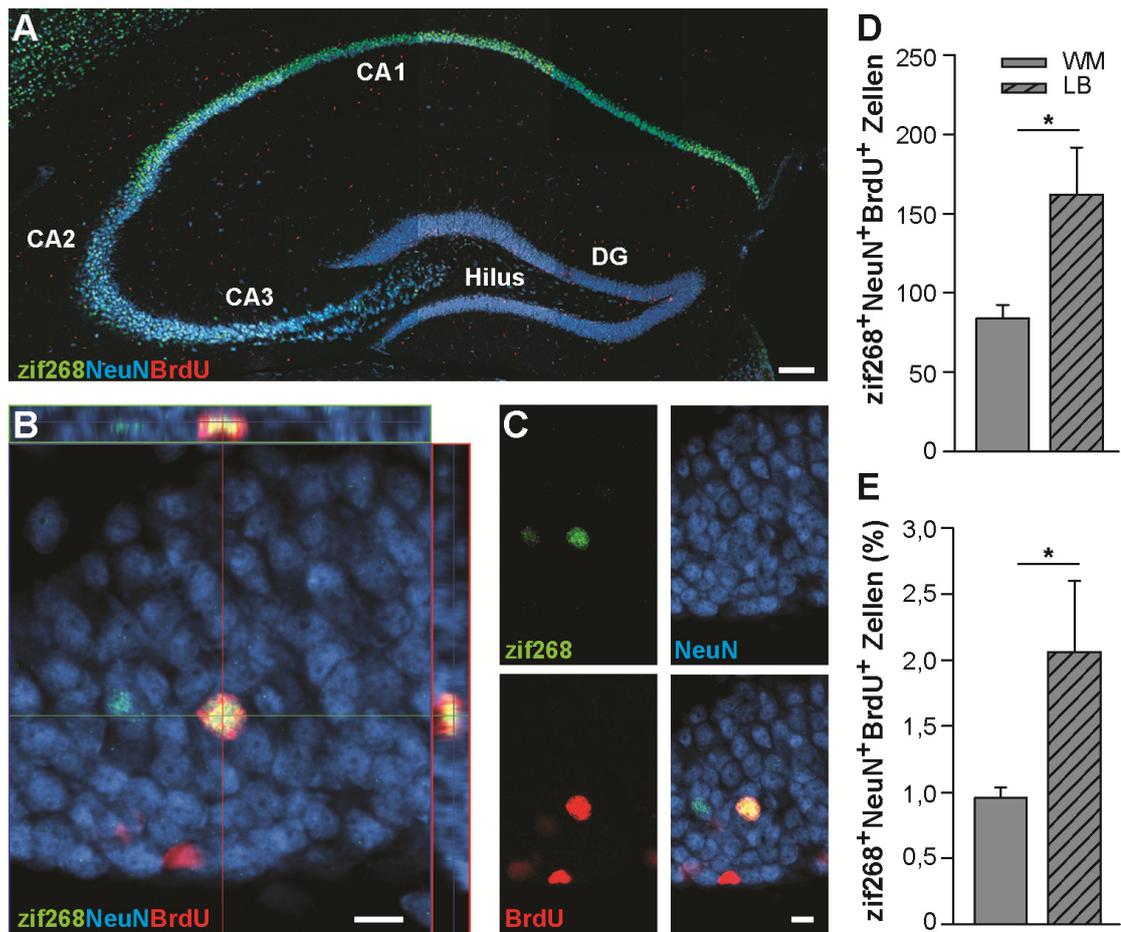


Abbildung 12: Expression von Zif268 in den Laufradgruppen. (A) Konfokales Übersichtsbild des Hippokampus mit Gyrus dentatus (DG), Hilus und der Ammonshornformation (CA1-3, Maßstab 100 μ m). Auffällig ist die Expressionsdominanz in CA1. (B, C) Höhere Vergrößerung von klar dreifach markierten Zellen (Maßstab 10 μ m). (D) Anzahl und (E) Anteil der aktivierten Neurone nach Wasserlabyrinth (WM) und Leiterlauf (LB) im Vergleich (* $p < 0,05$, MWU-Test).

6. Diskussion

Die vorliegende Studie legt dar, dass ein kleiner Anteil der im Gyrus dentatus des Hippokampus nach Schlaganfall neu gebildeten Neurone auf verschiedene Stimuli reagiert. Training, sei es die Exploration einer reizreichen Umgebung oder das Nutzen eines Laufrades, steigert nach ischämischem Schlaganfall signifikant die Neurogenese und führt tendenziell zu einer besseren Lernleistung. Jedoch haben diese Trainingsformen keinen Einfluss auf die Aktivierbarkeit der neu entstandenen Neurone. Interessanterweise stimuliert die ‚sensomotorische‘ Aktivierung des Leiterlaufs einen signifikant höheren Anteil neuer Neurone als die ‚kognitive‘ Aktivierung im Morris Wasserlabyrinth. Dahingegen weist die laminäre Verteilung der stimulierten neuen Neurone nach ‚kognitiver‘ Aktivierung eine größere Spezifität in Verbindung mit rehabilitativem Training auf, da diese dann in signifikant höherem Anteil in der Körnerzellschicht aufzufinden sind.

6.1. Aktivierbarkeit neuer hippokampaler Neurone nach Ischämie

Beide, sowohl das ‚kognitive‘ als auch das ‚sensomotorische‘ Paradigma induzierten valide ein spezifisches Muster der c-fos und Zif268 Expression in der Hippokampusformation. Da die transiente Expression der IEGs die spezifische Antwort eines funktionellen neuronalen Netzwerkes auf einen bestimmten Verhaltensstimulus widerspiegelt, kann sie entsprechend als Marker für eine funktionelle Integration der IEG-exprimierenden Zellen in bestehende neuronale Netzwerke gewertet werden (Tischmeyer und Grimm 1999). Zellen mit allen drei Markern (BrdU, NeuN und ein IEG) sind demnach neu generierte, funktionell integrierte reife Neurone.

Die mittels c-fos gefundenen Prozentsätze aktivierter neuer Neurone von $0,21 \pm 0,04$ % nach WM und $0,41 \pm 0,06$ % nach LB sind nur sehr gering. Bei der Beurteilung dieser kleinen Zahlen ist jedoch zu beachten, dass in unseren Modellen insgesamt nur 1 - 2 % der gesamten Körnerzellen des Gyrus dentatus c-fos exprimieren. Diese Selektivität spricht für eine hohe Aufgabenspezifität der neuronalen Netzwerke und der aktivierten Neurone und kann demnach sogar als Qualitätskriterium gewertet werden. Eine Aktivierung sehr vieler Neurone würde man

bei einer generalisierten Aktivität neuronaler Netzwerke, wie sie zum Beispiel im Rahmen eines konvulsiven Anfalles vorkommt, erwarten. Die Integration von neuen Neuronen unter physiologischen Bedingungen mittels IEGs wurde bereits evaluiert und zeigt auch hier, dass die Erfassbarkeit aktivierter neuer Neurone mit dieser Methode gering ist, ein weiterer Beleg für die hohe Spezifität der IEGs im Rahmen aufgabenabhängiger Prozesse. Unter physiologischen Bedingungen beträgt der Anteil aktivierter (c-fos positiver) neuer Neurone im DG bis zu 10 % (Jessberger und Kempermann 2003, Kee et al. 2007, Tashiro et al. 2007). Jedoch können diese Zahlen nicht direkt auf die vorliegende Studie übertragen werden, da die Aktivierungsparadigmen nicht identisch sind. Sie geben dennoch einen weiteren Hinweis auf den Rahmen, innerhalb dessen sich die Aktivierung abspielt. Hier wären weitere Kontrollgruppen in zukünftigen Projekten von Nöten, um einen Einfluss der Ischämie auf die Zahl der aktivierten neuen Neurone zu evaluieren. Neben der Ischämie ist die Anwendung von nicht erlernten Aktivierungsparadigmen ein weiterer Unterschied zu bisherigen Studien mit einem höheren Prozentsatz aktivierter Neurone. Frühere Arbeiten (Schmidt-Hieber et al. 2004, Tashiro et al. 2007) belegen, dass die vulnerable Phase für die Integration und das Langzeitüberleben von neuen Neuronen die ersten vier Wochen nach Zellteilung sind. Innerhalb dieser Zeitperiode erhielten die Tiere im Rahmen der vorliegenden Arbeit rehabilitatives Training mittels zwei etablierter Stimulatoren von Neurogenese: der reizreichen Umgebung und dem Laufrad. Die Aktivierungsphase hingegen war in der achten Woche angesiedelt, einem Zeitpunkt zu dem die Integration bereits abgeschlossen ist, und beinhaltete den Leiterlauf und das Wasserlabyrinth. Beide Aktivierungsparadigmen waren den Tieren damit im Vergleich zur Integrationsphase unbekannt. Trouche und Kollegen (2009) haben gezeigt, dass die Rekrutierung von Neuronen mittels IEG Detektion am größten ist, wenn mit exakt der gleichen Aktivierung wie während der Lernphase stimuliert wird. Da dies hier nicht der Fall war, ist der Anteil aktivierter Neurone erwartungsgemäß geringer. Die vier-fach höhere Zahl aktivierter neuer Neurone, welche sich mit Zif268 erfassen lassen, gibt einen Hinweis darauf, dass die Anzahl aktivierbarer Neurone mit c-fos möglicherweise unterschätzt wurde. Da für c-fos jedoch aus früheren Studien genaue Aktivierungsmuster bekannt sind und sich in den eigenen Vorversuchen auch ein kräftigeres Fluoreszenzsignal für c-fos als für Zif268 auslösen ließ, wurde die Hauptauswertung mittels c-fos durchgeführt.

6.2. Einfluss des Trainings auf die Neurogenese und die Aktivierbarkeit

In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten konnte der positive Einfluss von rehabilitativem Training nach kleinen kortikalen Infarkten auf die Neurogenese im Gyrus dentatus nachwiesen werden. Für die reizreiche Umgebung konnte in der vorliegenden Arbeit nur eine tendenzielle Besserung der Lernleistung nachgewiesen werden. Die Ursache ist vermutlich in der kleinen Tierzahl bei gleichzeitig generell hoher interindividueller Variabilität bei experimentellen Verhaltenstests zu suchen. Physisches Training hat erwiesenermaßen einen fördernden Effekt auf räumlich-kognitive Leistungen (Kempermann et al. 1997b, van Praag et al. 1999, Wurm et al. 2007) und verbessert nach Schlaganfall generell das Outcome, sowohl in experimentellen (Johansson und Ohlsson 1996, Nygren und Wieloch 2005, Knieling et al. 2009) als auch in klinischen Studien (Kollen et al. 2006). Es ist nun von besonderem Interesse, ob die bessere Leistung auf die erhöhte Neurogenese zurückzuführen ist und welchen Anteil die neuen Neurone bei der Rehabilitation einnehmen. Man sollte erwarten, dass eine erhöhte Neurogenese und eine bessere Funktionalität nach rehabilitativem Training mit einer gesteigerten Integration der neuen Neurone einhergehen. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden: Der Anteil aktivierter neuer Nervenzellen wurde durch Training nicht erhöht. Dieses Ergebnis deckt sich jedoch mit denen von Tashiro und Kollegen (Tashiro et al. 2007), welche in ihrer Arbeit keinen Einfluss von Training auf die c-fos positiven Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen konnten. In der vorliegenden Arbeit stieg die Neurogenese nach Laufradnutzung an, wie auch in den Laufradgruppen eine höhere Anzahl aktivierbarer Zellen im Vergleich zu den Kontrollen auftrat. Der Anteil aktivierter neuer Zellen bezogen auf die Anzahl neuer Zellen blieb demnach rechnerisch gleich. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Gruppen aus der reizreichen Umgebung eine geringere Anzahl aktivierter neuer Neurone bei gesteigerter Neurogenese im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen. Die hieraus resultierende tendenziell geringere prozentuale Aktivierung nach reizreicher Umgebung deckt sich ebenfalls mit den Ergebnissen der Arbeit von Tashiro et al. (2007). Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Auswirkung der beiden Trainingsformen ist in unterschiedlichen Mechanismen zu suchen, welche die Integration beeinflussen. So weiß man zur adulten Neurogenese, dass eine reizreiche Umgebung das Überleben neu generierter Neurone verlängert

(Kempermann et al. 1998, Kempermann et al. 2010), während Laufradtraining die Proliferation steigert (van Praag et al. 1999, Kempermann et al. 2010). Im Ergebnis führt beides zu einer erhöhten Anzahl neuer Neurone. Es ist vorstellbar, dass spezifische Modifikationen des Integrationsprozesses zu einer veränderten Synaptogenität und Konnektivität der neuen Neurone je nach Art des rehabilitativen Trainings führt, was sie unterschiedlich antworten lässt (Jakubs et al. 2006, Tashiro et al. 2007). Nach der Reservehypothese (Kempermann 2008) werden nach physischem Training (z.B. Laufrad) mehr neue Neurone gebildet, um auf eine neue Aufgabe besser reagieren zu können. Durch den Stimulus einer reizreichen Umgebung könnten neue Neurone spezifisch vernetzt werden, was zu einem selektiven Überleben dieser Neurone führt. Die vorliegenden Daten deuten an, dass diese neuen Neurone möglicherweise in geringerem Ausmaß für andere Aufgaben aktivierbar sind. Alternativ könnte man auch postulieren, dass sich das kortikohippokampale Netzwerk von Tieren nach Exposition in einer reizreichen Umgebung nach Schlaganfall auf einem geschulteren Level befindet, und zur Absolvierung einer neuen Aufgabe weniger Zellen benötigt, als Kontrolltiere ohne entsprechendes rehabilitatives Training.

Eine weitere Auswirkung des rehabilitativen Trainings ist die höhere Aktivierung neuer Nervenzellen aus der Körnerzellschicht bei Absolvierung des hippocampusabhängigen Wasserlabyrinthes im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Verschiebung aktivierter neuer Neurone tritt bei der Absolvierung des motorischen Leiterlaufparadigmas nicht auf. Die meist postulierte Aufgabe des Hippokampus ist vor allem die Auflösung von zeitlich-räumlichen Mustern und die Konsolidierung von Gedächtnisinhalten (Gould E. et al. 1999, Kempermann 2002, Schinder und Gage 2004). In der Körnerzellschicht sind vor allem reife Neurone anzutreffen, während die Subgranularzone vorwiegend einer Regenerationszone mit neuronalen Vorläuferzellen entspricht. In der vorliegenden Studie konnte eine größere Anzahl neuer Neurone in der GCL nur nach Laufradtraining nachgewiesen werden. Die verstärkte Rekrutierung neuer Neurone trat jedoch auch nach reizreicher Umgebung und WM-Aktivierung auf. Welchen Einfluss die Lage der neuen Neurone hat, ist bisher nicht bekannt. Die laminäre Verschiebung der genutzten Zellen innerhalb der verschiedenen Zellschichten spricht für eine sehr diffizile Modulation der Plastizität durch das rehabilitative Training nach Schlaganfall. Es ist vorstellbar, dass eine

durch Training erhöhte Anzahl an Neuronen besser für eine auf den Hippokampus abgestimmte Aufgabe (Wasserlabyrinth) aus der GCL genutzt, also aktiviert, werden kann.

6.3. Der Gyrus dentatus und sensomotorische Aktivität

Die sensomotorische Aufgabe Leiterlauf führte zu einer generellen Steigerung der Aktivität der neuen Neurone. Das Verteilungsmuster innerhalb der Schichten des DG war jedoch unspezifisch und nicht durch Training beeinflussbar. Aufgrund der oben schon dargelegten Aufgaben des Hippokampus ist es von großem Interesse herauszufinden, warum ausgerechnet diese Struktur so viel stärker auf das motorische als auf das hippokampale/kognitive Paradigma reagiert. Die vorliegende Arbeit ist (nach gründlichem Studium der vorliegenden Literatur) die erste Studie, welche zwei solche Paradigmen direkt vergleicht. Es wurde schon früher eine Steigerung der hippokampalen c-fos Expression nach motorischer Aktivität beschrieben (Oladehin und Waters 2001, Lee et al. 2003), jedoch wurde bei diesen Studien das Laufen in sogenannten Tretmühlen erzwungen und lediglich zu Kontrollen ohne motorische Aktivität beschrieben. In diesen früheren Arbeiten wurde daher hauptsächlich eine stressinduzierte Steigerung der IEG Expression postuliert. Dies mag eine Rolle spielen, jedoch ist nicht von der Hand zu weisen, dass das Wasserlabyrinth ein sehr aversiver Test ist, besonders für Mäuse, welche keine natürlichen Schwimmer sind (Whishaw et al. 2001). Es ist daher nachvollziehbar, dass die Schwimmer eigentlich größeren Stress als die Leiterlaufläufer haben müssten. Deshalb kann eine Abhängigkeit der erhöhten Aktivierung von der sensomotorischen Funktion selbst postuliert werden. Selbstverständlich hat auch das Wasserlabyrinth eine motorische Komponente, jedoch zeigte schon Vanderwolf in einer sehr frühen Arbeit an Nagern (Vanderwolf 1969), dass freiwillige Bewegungen, wie z.B. Laufen, mit einer rhythmischen Theta-Aktivität im Hippokampus assoziiert ist, während automatische Bewegungen, wie z.B. Kauen, diese Aktivität nicht aufweisen. Ob Schwimmen nun eine freiwillige oder automatische Bewegung ist, ist unklar, jedoch gibt es unterschiedliche Bewegungsformen mit unterschiedlichen Mustern im Hippokampus und Laufen ist eine freiwillige Bewegung mit assoziierter Aktivität im Hippokampus. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützten daher die

Hypothese, dass der Gyrus dentatus nach Schlaganfall in motorische Regeneration und motorisches Lernen involviert ist.

7. Schlussfolgerung

Ein kleiner Teil der nach Schlaganfall im Gyrus dentatus generierten neuen Neurone wird funktionell in das bestehende kortikohippokampale Netzwerk integriert. Es ist nicht möglich für jedes nach Schlaganfall generierte Neuron eine Aussage zu treffen, ob es durch den Schlaganfall induziert worden ist. Jedoch sind alle mit BrdU markierten Zellen zeitlich nach dem Schlaganfall entstanden und der Einfluss einer kortikalen Ischämie auf die hippokampale Neurogenese ist in der Literatur gut belegt (Jin et al. 2001) und in der Vergangenheit auch in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen worden. Demnach sind die neuen Neurone in der vorliegenden Arbeit entsprechend einem gängigen Modell zur Schlaganfallforschung unter postischämischen Bedingungen generiert worden. Zum Anderen ist es aufgrund der verwendeten Methodik der IEGs nicht möglich alle neuen Neurone zu erfassen, sondern nur jene, welche für die zu absolvierende Aufgabe genutzt werden. Daher kann man bezüglich anderer Neurone nicht sagen, ob sie im Rahmen einer anderen Aufgabe ebenfalls funktionell nutzbar wären, oder ob sie möglicherweise eine abberante Integration aufweisen und nicht rekrutierbar sind. Möglicherweise liegt ein heterogenes Muster korrekt und abberant eingegliedert Neurone vor, ähnlich wie in Modellen experimentell induzierter Epilepsien (Jessberger et al. 2007, Murphy et al. 2011). Unbeeinflusst bleibt jedoch unsere Kernaussage, dass ein Teil der neuen Neurone funktionell integriert wird und nutzbar ist.

Rehabilitatives Training steigert die Aktivierbarkeit der neuen Neurone nicht. Jedoch scheint das Training die Plastizität auf einer sehr viel feineren Stufe als nur der reinen Anzahl funktionell tätiger Neurone zu modulieren: Das räumliche Verteilungsmuster der durch eine kognitive Aufgabe nach vorausgegangenem Training aktivierten neuen hippokampalen Neurone in der Körnerzellschicht weist auf eine spezifische Nutzung der neuen Zellen im Rahmen von räumlichem Lernen und Gedächtnisbildung hin. Es ist zu diskutieren, ob ein verbessertes Outcome in einem Verhaltenstest nicht in einer größeren Anzahl aktivierter Zellen Ausdruck findet, sondern vielmehr in der selektiveren Aktivierung von Neuronen der GCL.

Die nach Schlaganfall neu generierten Neurone sind aufgrund der größeren Anzahl rekrutierter neuer Neurone bei entsprechender Aufgabe möglicherweise an sensomotorischem Lernen und sensomotorischer Rehabilitation nach cerebraler

Ischämie beteiligt, wenn auch aufgrund des Verteilungsmusters eher unspezifisch. Ob die nachgewiesenen neuen funktionellen Neurone für die Langzeiterholung und adaptative Prozesse nach Schlaganfall relevant sind, konnte nicht abschließend geklärt werden, da die Korrelation zu den Verhaltensexperimenten in der vorliegenden Studie nicht signifikant war. Jedoch wurden auch schon in der Vergangenheit verschiedene Modelle postuliert, welche erklären helfen sollten, dass schon wenige neue Neurone (unter physiologischen Bedingungen) durchaus eine relevante Funktion in speziellen Netzwerksituationen erfüllen (Wiskott et al. 2006, Kempermann 2008).

Weitere Studien sind notwendig, um erstens zu klären, ob die Ischämie selbst einen Einfluss auf die Aktivierbarkeit der neuen Neurone hat und zweitens die Funktionalität der übrigen, mit den hier verwendeten IEGs nicht erfassbaren, neuen Neurone zu überprüfen. Hilfreich wären Kombinationen mit detaillierten Verhaltensanalysen und Neurogeneseablationsmodellen.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

Aggleton JP, Brown MW. 2005. Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging. *Q J Exp Psychol B*, 58:218–233.

Beck H, Semisch M, Culmsee C, Plesnila N, Hatzopoulos AK. 2008. Egr-1 regulates expression of the glial scar component phosphacan in astrocytes after experimental stroke. *Am J Pathol*, 173:77–92.

Bertaina-Anglade V, Tramu G, Destrade C. 2000. Differential learning-stage dependent patterns of c-Fos protein expression in brain regions during the acquisition and memory consolidation of an operant task in mice. *Eur J Neurosci*, 12:3803–3812.

Carlén M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisén J. 2002. Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol*, 12:606–608.

Cayre M, Canoll P, Goldman JE. 2009. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol*, 88:41–63.

Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, 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*, 325:210–213.

Cole AJ, Abu-Shakra S, Saffen DW, Baraban JM, Worley PF. 1990. Rapid rise in transcription factor mRNAs in rat brain after electroshock-induced seizures. *J Neurochem*, 55:1920–1927.

Cole AJ, Saffen DW, Baraban JM, Worley PF. 1989. Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature*, 340:474–476.

Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. 2009. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience*, 158:1021–1029.

Encinas JM, Vaahtokari A, Enikolopov G. 2006. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:8233–8238.

Gould E., Tanapat P., Hastings N.B., Shors T.J. 1999. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci*, 3:186–192.

Jakubs K, Nanobashvili A, Bonde S, Ekdahl CT, Kokaia Z, Kokaia M, Lindvall O. 2006. Environment matters: synaptic properties of neurons born in the epileptic adult brain develop to reduce excitability. *Neuron*, 52:1047–1059.

Jessberger S, Zhao C, Toni N, Clemenson GD, JR., Li Y, Gage FH. 2007. Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labelling. *J Neurosci*, 27(35):9400–9407.

Jessberger S, Kempermann G. 2003. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci*, 18:2707–2712.

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*, 98:4710–4715.

Johansson BB, Ohlsson AL. 1996. Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. *Exp Neurol*, 139:322–327.

Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW. 2007. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 10:355–362.

Keiner S, Witte OW, Redecker C. 2009. Immunocytochemical detection of newly generated neurons in the perilesional area of cortical infarcts after intraventricular application of brain-derived neurotrophic factor. *J Neuropathol Exp Neurol*, 68:83–93.

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.

Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. 1998. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Current Biology*, 8 (16):939–942.

- 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.*, 94:10409–10414.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997b. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386:493–495.
- Kempermann G. 2002. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*, 22:635–638.
- Kempermann G. 2008. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends Neurosci*, 31:163–169.
- 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.
- 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. *J. Neurosci.*, 135:723–735.
- Knieling M, Metz GA, Antonow-Schlorke I, Witte OW. 2009. Enriched environment promotes efficiency of compensatory movements after cerebral ischemia in rats. *Neuroscience*, 163:759–769.
- Kollen B, Kwakkel G, Lindeman E. 2006. Functional recovery after stroke: a review of current developments in stroke rehabilitation research. *Rev Recent Clin Trials*, 1:75–80.
- Kovács KJ. 2008. Measurement of immediate-early gene activation - c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol*, 20:665–672.
- 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.*, 21:324–332.
- Laplagne DA, Espósito 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.

- Lee T, Jang M, Shin M, Lim B, Kim Y, Kim H, Choi H, Lee K, Kim E, Kim C. 2003. Dependence of rat hippocampal c-Fos expression on intensity and duration of exercise. *Life Sci*, 72:1421–1436.
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. 2000. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*, 405:951–955.
- Murphy BL, Pun RYK, Yin H, Faulkner CR, Loepke AW, Danzer SC. 2011. Heterogeneous Integration of Adult-Generated Granule Cells into the Epileptic Brain. *Journal of Neuroscience*, 31:105–117.
- Nygren J, Wieloch T. 2005. Enriched environment enhances recovery of motor function after focal ischemia in mice, and downregulates the transcription factor NGFI-A. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25:1625–1633.
- Ohira K, Furuta T, Hioki H, Nakamura KC, Kuramoto E, Tanaka Y, Funatsu N, Shimizu K, Oishi T, Hayashi M, Miyakawa T, Kaneko T, Nakamura S. 2009. Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. *Nat Neurosci*.
- Oladehin A, Waters RS. 2001. Location and distribution of Fos protein expression in rat hippocampus following acute moderate aerobic exercise. *Exp Brain Res*, 137:26–35.
- 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.*, 17:3727–3738.
- Paxinos G 2001. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press.
- Pláteník J, Kuramoto N, Yoneda Y. 2000. Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci*, 67:335–364.
- Rakhade SN, Shah AK, Agarwal R, Yao B, Asano E, Loeb JA. 2007. Activity-dependent gene expression correlates with interictal spiking in human neocortical epilepsy. *Epilepsia*, 48 Suppl 5:86–95.

Schinder AF, Gage FH. 2004. A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function. *Physiology (Bethesda)*, 19:253–261.

Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *letters to Nature*, 429:184–187.

Schroeter M, Jander S, Stoll G. 2002. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. *J Neurosci Methods*, 117:43–49.

Sharp FR, Liu J, Bernabeu R. 2002. Neurogenesis following brain ischemia. *Brain Res Dev Brain Res*, 134:23–30.

Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410:372–376.

Sirko S, Neitz A, Mittmann T, Horvat-Bröcker A, Holst A von, Eysel UT, Faissner A. 2009. Focal laser-lesions activate an endogenous population of neural stem/progenitor cells in the adult visual cortex. *Brain*.

Tashiro A, Makino H, Gage FH. 2007. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J. Neurosci.*, 27(12):3252–3259.

Tischmeyer W, Grimm R. 1999. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci*, 55:564–574.

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*, 11:901–907.

Trouche S, Bontempi B, Rouillet P, Rampon C. 2009. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:5919–5924.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 2:266–270.

van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415:1030–1034.

Vanderwolf CH. 1969. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 26:407–418.

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*, 169:1279–1286.

Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. 1985. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.*, 17:497–504.

Whishaw IQ, Metz GA, Kolb B, Pellis SM. 2001. Accelerated nervous system development contributes to behavioral efficiency in the laboratory mouse: a behavioral review and theoretical proposal. *Dev Psychobiol*, 39:151–170.

Wiskott L, Rasch MJ, Kempermann G. 2006. A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus*, 16:329–343.

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*, 38:2833–2840.

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*, 218:301–308.

9. Anhang

9.1. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Christoph Redecker für die Überlassung des interessanten Themas, Herrn Prof. Dr. Otto W. Witte für die Möglichkeit einer Promotion, Julia Oberland und Claudia Sommer für ihre exzellente technische Assistenz, Silke Keiner für ausgezeichnete Anleitung und Unterstützung, Josephine Walter für die Beantwortung mancher Frage, sowie meiner Familie für Zeit und Geduld.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn PD Dr. med. Andrey Irintchev, Leiter des neurowissenschaftlichen Forschungslabors der Klinik für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde, für die freundliche Zurverfügungstellung der Mausleiter.

9.2. Förderung

Stipendium der Ernst-Abbe-Stiftung Jena (IZKF Projekt TP 1.3 für C.S. Geibig).

9.3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vornamen	Geibig, Christiane Susanne
Geburtsdatum	08.04.1981
Geburtsort	Darmstadt
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	röm.-kath.
Familienstand	verheiratet / 2 Kinder

Schulische Ausbildung

08/1991 - 06/1997	Gymnasium der Otto-Hahn-Schule, Hanau
08/1997 - 06/2000	Berufliches Gymnasium der Ludwig-Geißler-Schule, Hanau, Fachbereich Chemietechnik, Abitur (Note 1,0)

Studium

09/2000 - 06/2007	Friedrich-Schiller-Universität Jena, Humanmedizin, Staatsexamen (Note 2,66)
09/2006 - 02/2008	Mutterschutz und Erziehungszeit
seit 03/2008	Promotion zum Thema „Funktionelle Integration neu gebildeter hippokampaler Neurone nach experimentellen Schlaganfällen“, Klinik für Neurologie der FSU Jena, Betreuer: Prof. Dr. med. C. Redecker

Berufliche Erfahrung und Tätigkeiten

1997 - 2000	Durchführung von Sanitätsdiensten (Sanitätshelfer) für die Deutsche Lebensrettungsgesellschaft (DLRG) Maintal
-------------	--

01/2002 - 12/2003	Studentische Hilfskraft am Klinikum der FSU Jena, Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Normalstation) und Klinik für Anästhesiologie (Intensivtherapeutische Station)
WS 2002/2003	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie der FSU
seit 02/2008	Mitarbeit in der Lehre der Klinik für Neurologie der FSU
seit 09/2009	Assistenzärztin in der Klinik für Neurologie der FSU

Wissenschaftliche Arbeiten, Auszeichnungen und Stipendien

1995/1996	Jugend forscht, Fachbereich Chemie, Thema „Bestimmung von Bleigehalt in Haaren“
1996/1997	Dr. Hermann Messer-Preis (Jugendumweltpreis) der Stadt Hanau, Thema „Bestimmung der Wassergüte der Braubach“
04/2008 - 03/2009	Promotionsstipendium des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) der Medizinischen Fakultät der FSU Jena (Stipendium der Ernst-Abbe-Siedlungs GmbH)
09/2009	Vortrag „Immunocytochemical evidence for functional integration of newborn hippocampal neurons after stroke“ zum Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) 2009 in Nürnberg
10/2009	Posterpräsentation „Task specific response of newborn hippocampal neurons after cortical stroke“ zum Kongress der Society of Neuroscience (SfN) 2009 in Chicago, USA
12/2009	Vortrag „Intermittierende Fieberschübe“ zur neurologischen Fallkonferenz der Thüringer Gesellschaft für Psychiatrie, Neurologie und Kinder- und Jugendpsychiatrie
04/2011	Einreichen der vorliegenden Arbeit „Functional recruitment of newborn hippocampal neurons after ischemic lesions“: „in Revision“

9.4. 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. S. Keiner, Prof. Dr. med. C. Redecker, D. Geibig

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.

Jena, den