

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss von aktivem Lebensstil und physischer Aktivität auf die
adulte hippocampale Neurogenese und spatiale Kognition unter
physiologischen und pathologischen Bedingungen im Mausmodell.

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Deetje Margarethe Iggena

aus Jever

Datum der Promotion: 16.Juni 2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abstract (deutsch)	8
Abstract (englisch)	9
1. Einleitung	10
2. Methodik und Material	11
2.1. Tiere	11
2.2. Studiendesign	12
2.2.1. TV-Studie	12
2.2.2. Jetlag-Studie	12
2.2.3. Sport-Diät-Studie	13
2.2.4. Sport-MPTP-Studie.....	14
2.3. Gewebevor- und aufbereitung.....	14
2.3.1. 5´-Bromo-2´-desoxy-Uridin Injektion.....	14
2.3.2. Gewebeextraktion und -zuschnitt.....	16
2.4. Histologie	16
2.4.1. Immunhistochemie	16
2.4.2. Immunofluoreszenz.....	17
2.5. Molekularbiologie	17
2.5.1. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	17
2.5.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	18
2.5.3. Enzymatisches Immunadsorptionsverfahren.....	18
2.6. Verhaltenstests	18
2.6.1. Rotarod	18
2.6.2. Morris-Wasserlabyrinth	18
2.7. Statistische Analyse und Darstellung.....	19
3. Ergebnisse	19

3.1. TV-Studie	19
3.2. Jetlag-Studie	21
3.3. Sport-Diät-Studie	22
3.4. Sport-MPTP-Studie	23
4. Diskussion	25
4.1. Schlussfolgerung	27
5. Referenzen	28
Eidesstaatliche Versicherung	32
Anteilerklärung an den ausgewählten Publikationen	33
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	35
Lebenslauf	79
Komplette Publikationsliste	81
Danksagung	83

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
Abb	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse, engl.: Analysis of variance,
BDNF	Vom Gehirn stammender Wachstumsfaktor, engl.: Brain-derived neurotrophic factor
BrdU	5'-Bromo-2'-desoxy-Uridin
C	Celsius
CD	Kontrolldiät
CD-R	Gruppe mit Kontrolldiät und Laufrad
CD-S	Gruppe mit Kontrolldiät ohne Laufrad
cm	Zentimeter
CTR	Kontrollgruppe
CTR-R	Kontrollgruppe mit Laufrad
CTR-S	Kontrollgruppe ohne Laufrad
DCX	Doublecortin
DG	Gyrus Dentatus
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DIR	Gruppe, die mit reizreicher Umgebung direkt interagiert
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylessig engl.: 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid
drD1a	Dopaminrezeptor D1a
drD2	Dopaminrezeptor D2
drD5	Dopaminrezeptor D5
ELISA	Enzymatisches Immunadsorptionsverfahren, engl.: Enzyme-linked immunosorbent assay
engl	Englisch
ENR	Käfige mit einer reizreichen Umgebung, engl.: environmental enrichment
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin

g	Gramm
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Saures Gliafaserprotein, engl.: glial fibrillary acid protein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HFD	Hochkalorische Ernährung, engl.: High-fat diet
HFD-R	Gruppe mit hochkalorischer Ernährung und Laufrad
HFD-S	Gruppe mit hochkalorischer Ernährung ohne Laufrad
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl.: high performance liquid chromatography
HVA	Homovanillinsäure
IND	Gruppe, die mit reizreicher Umgebung indirekt interagiert
i.p.	intraperitoneale Applikation
IPS	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
JL	Jetlag
JL-CTR	Gruppe mit Jetlag
JL-ENR	Gruppe mit Jetlag in reizreicher Umgebung
JL-Mel	Gruppe mit Jetlag und Melatonin-Gabe
Kcal	Kilokalorien
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LT	Langzeit, engl.: Long-term
m	Meter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
MPTP-R	Mit MPTP behandelte Gruppe und Laufrad

MPTP-S	Mit MPTP behandelte Gruppe ohne Laufrad
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MWM	Morris-Wasserlabyrinth, engl.: Morris water maze
N	Größe der Grundgesamtheit
NaCl	Kochsalzlösung
NaN ₃	Natriumazid
NiCl ₂	Nickelchlorid
NPCs	Neurale proliferierende Zellen
NSCs	Neurale pluripotente Stammzellen
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, engl.: phosphat buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
p.o.	per os
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion, engl.: quantitative polymerase chain reaction
s	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SGZ	Subgranuläre Zone
SN	Substantia Nigra
ST	Kurzzeit, engl.: short-term
Upm	Umdrehungen pro Minute
vs	versus

Abstract (deutsch)

Einleitung: Neurodegenerative Erkrankungen und das Altern gehen mit neuronalen Verlusten und kognitiven Defiziten einher. Häufig betroffen sind der Hippokampus und die hippokampusabhängige spatiale Kognition. Die gezielte Steigerung der im Hippokampus lokalisierten adulten Neurogenese bietet die Perspektive, neurodegenerativen Prozessen durch den Aufbau einer neurogenen Reserve entgegenzuwirken. In dieser Arbeit evaluieren wir in vier Mausmodellen das pro-neurogene und -kognitive Potenzial von Lebensstilinterventionen auf die hippokampale Neurogenese und die spatiale Kognition unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

Methodik: Zum einen untersuchten wir ob die alleinige Wahrnehmung einer reizreichen Umgebung ausreichend ist, um als pro-neurogener und -kognitiver Lebensstil zu wirken. Zum anderen verglichen wir die Wirkung einer reizreichen Umgebung mit dem Therapeutikum Melatonin in einem Modell zirkadianer Dysrhythmie. Den Einfluss physischer Aktivität als einzelne Komponente eines aktiven Lebensstils untersuchten wir zum einen im Mausmodell einer hochkalorischen Ernährung und zum anderen im Dopamindepletionsmodell. Zur Beurteilung der hippokampalen Neurogenese verwendeten wir die BrdU-Inkorporationsmethode und quantifizierten sowie phänotypisierten immunhistologisch die BrdU⁺-Zellen. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Polymerasekettenreaktion nutzten wir zur Evaluation des Dopaminstoffwechsels und im ELISA bestimmten wir Neurotrophine. Die Motorik der Tiere testeten wir im Rotarod und die spatiale Kognition im Morris-Wasserlabyrinth.

Ergebnisse: Wir stellten fest, dass nur ein aktiver Lebensstil mit direkter Interaktion mit einer reizreichen Umgebung – und nicht die alleinige Wahrnehmung dieser – ausreichend ist, um pro-neurogen und pro-kognitiv zu wirken. Ein aktiver Lebensstil wirkte zwar ebenfalls unter zirkadianer Dysrhythmie pro-neurogen und konnte eine defizitäre neuronale Regeneration ausgleichen, jedoch konnte nur Melatonin zusätzlich die kognitiven Folgen kompensieren. Physische Aktivität, die simultan zu einer hochkalorischen Ernährung begonnen wurde, kann den negativen Folgen der Diät auf die spatiale Kognition durch Förderung der adulten hippokampalen Neurogenese ohne Modulation durch BDNF vorbeugen. Ähnlich positiv wirkte physische Aktivität im Dopamindepletionsmodell, indem die negativen Folgen der Dopamindepletion auf die hippokampale Neurogenese und die spatiale Kognition reduziert wurden und der pathologisch gesteigerte Dopaminumsatz wieder herunterreguliert wurde.

Schlussfolgerung: Diese Arbeit zeigt, dass ein aktiver Lebensstil und physische Aktivität die hippokampale Neurogenese und spatiale Kognition sowohl unter physiologischen, als auch unter pathologischen Bedingungen positiv beeinflussen. Dabei haben sie jedoch nicht immer das Potenzial neuronale und kognitive Defizite vollständig zu kompensieren.

Abstract (English)

Introduction: Neurodegenerative diseases and aging come along with neuronal loss and cognitive decline. The hippocampus and the hippocampus-dependent spatial cognition are commonly affected. The specific promotion of adult neurogenesis, localized in the hippocampus, offers the perspective to generate a neurogenic reserve for preventing neurodegenerative processes. In this thesis, we evaluate the pro-neurogenic and -cognitive potential of lifestyle interventions on hippocampal neurogenesis and spatial cognition under physiological and pathological conditions in four different mouse models.

Methods: First, we investigated if the mere perception of an enriched environment is sufficient to act as a pro-neurogenic and -cognitive lifestyle. Second, we compared the effects of the lifestyle intervention environmental enrichment with the hormone melatonin in a model of circadian dysrhythmia. Furthermore, we investigated the influence of physical activity in a high-fat diet mouse model and in a model of dopamine depletion. We applied the BrdU-incorporation method to immunohistologically quantify and typify hippocampal neurogenesis. We used high-performance liquid chromatography and the polymerase chain reaction to evaluate the dopamine metabolism and determined neurotrophins in the enzyme-linked immunosorbent assay. In the Rotarod, we analysed the motor-abilities of the mice and in the Morris water maze, we tested spatial cognition.

Results: Contrary to direct interaction with environmental enrichment, the mere perception of an enriched environment was insufficient to induce pro-neurogenic and pro-cognitive potential. Furthermore, interaction with environmental enrichment, resembling an active lifestyle, compensated the detrimental influence of circadian dysrhythmia on neural regeneration, but not on cognition. Meanwhile, melatonin prevented both neural and cognitive deficits. Physical activity simultaneously initiated with a high-fat diet prevented the consequences of the diet on hippocampal neurogenesis and spatial cognition without modulation by BDNF. Similar, physical activity reduced the neural and cognitive deficits in a model of dopamine depletion and downregulated a pathologically increased dopamine turnover.

Conclusion: An active lifestyle and physical activity positively influence hippocampal neurogenesis and spatial cognition under physiological and pathological conditions. However, lifestyle interventions do not always have the potential to completely compensate neural and cognitive deficits.

1. Einleitung

Ein Leben lang können sich neue Neurone in der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus Dentatus (DG) in der Hippokampus-Formation bilden¹⁻⁶. Dort befinden sich pluripotente Stammzellen (NSCs), die kontinuierlich proliferierende neuronale Vorläuferzellen (NPCs) generieren. Die NPCs migrieren aus der SGZ in die granuläre Zone und differenzieren zu Neuronen⁷. Initial entwickelt sich aus der Glia-ähnlichen Stammzelle (Typ-1) die rapide proliferierende und transient amplifizierende Vorläuferzelle (Typ-2a). Diese Typ-2a-Zelle exprimiert neuronale Marker wie Doublecortin (DCX), durch die sie zur Typ-2b-Zelle wird. Die wiederum differenziert zum Neuroblasten (Typ-3), der in das post-mitotische Stadium eines unreifen Neurons übergeht, in der granulären Zone maturiert und sich in das lokale Netzwerk integriert⁷⁻¹⁰. Vor allem im frühen post-mitotischen Stadium sterben 25 % bis 75 % der neugeborenen Zellen wieder ab¹⁰⁻¹². Die überlebenden Neurone beginnen zwei Wochen nach ihrer Geburt auf externe Stimuli wie das spatiale Kognitionstraining im Morris-Wasserlabyrinth (MWM) zu reagieren und werden für Lernvorgänge bevorzugt rekrutiert^{10,13}. Der Hippokampus selbst wird aufgrund seiner Rolle in der Prozession von Gedächtnisinhalten als „Pfortner“ des Gedächtnisses bezeichnet¹⁴. Neben synaptischer Plastizität und Langzeitpotenzierung wird die adulte hippocampale Neurogenese als neuer Faktor für die hippocampale Gedächtniskonsolidierung in Betracht gezogen. Mehrfach wurde ein Zusammenhang zwischen intakter hippocampaler Neurogenese und spatialer Kognition dargestellt¹⁵⁻¹⁹. Besonders die Verknüpfung von spatialen und temporalen Informationen sowie die Gedächtnisflexibilität für die Anwendung erlernter Informationen auf neue Situationen, scheinen von der intakten hippocampalen Neurogenese abzuhängen^{18,20,21}. Die hippocampale Neurogenese wird sowohl durch internale als auch durch externale Faktoren moduliert^{3,22-24}. In einer alternden Gesellschaft könnte die bewusste Beeinflussung der adulten Neurogenese zum Aufhalten des kognitiven Abbaus und neurodegenerativer Prozesse beitragen. Ziel dieser Arbeit ist es daher, Lebensstilinterventionen als Modulationsfaktoren der hippocampalen Neurogenese unter vier verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen zu untersuchen.

Ein pro-neurogener Lebensstilstimulus ist die reizreiche Umgebung, bestehend aus nicht-animierten und sozialen Stimuli^{25,26}. Das Leben in dieser Umgebung führt zu einem verstärkten Überleben von hippocampalen Neuronen und besserer spatialer Kognition^{3,4,20}. In einer Zeit, in der Menschen häufig passiv vor Bildschirmen sitzen, haben wir in der **TV-Studie** mit einem TV-ähnlichen Set-Up untersucht, inwiefern die reine Wahrnehmung einer reizreichen Umgebung ausreichend ist, um neuronal und kognitiv stimulierend zu wirken.

Auch die „innere Uhr“ beeinflusst die hippocampale Neurogenese. Zirkadiane Dysrhythmie, induziert durch manipulierte Hell-/Dunkelphasen, verringert das Volumen des Temporallappens,

beeinträchtigt die adulte hippocampale Neurogenese und führt zu dysfunktionaler spatialer Kognition²⁷⁻²⁹. Informationen wie eine zirkadiane Dysrhythmie, die Differenzierungsstadien der hippocampalen Neurone beeinflusst und sich auf die spatiale Kognition auswirkt, könnten entscheidend sein für die Evaluation passender Therapien. Wir untersuchten daher in der **Jetlag-Studie** das therapeutische Potenzial des pro-neurogen und -kognitiv wirkenden Hormons Melatonin sowie eines aktiven Lebensstils in einer reizreichen Umgebung in einem Modell chronischer zirkadianer Dysrhythmie.

Eine hochkalorische Ernährung (HFD) führt nicht nur zu Übergewicht und steigert das kardiovaskuläre Risiko, sondern induziert auch neuronale und kognitive Defizite^{30,31}. Besonders die auf hippocampale Integrität angewiesenen Gedächtnisfunktionen sind davon betroffen³². Dagegen reduziert physische Aktivität als Lebensstilintervention Übergewicht, steigert Gedächtnisleistungen, erhöht das hippocampale Volumen und kompensiert die Folgen von HFD auf die hippocampalen Neurogenese und spatiale Kognition^{33,34}. Wir untersuchten in unserer **Sport-Diät-Studie**, inwiefern die positiven Effekte physischer Aktivität auf die Kognition im HFD-Mausmodell durch die hippocampale Neurogenese moduliert werden.

Neben Lebensstilfaktoren induzieren auch Erkrankungen Neurodegeneration im zentralen Nervensystem. Ein Beispiel dafür ist das idiopathische Parkinsonsyndrom (IPS), das sowohl mit einem Untergang von dopaminergen Neuronen in der Substantia Nigra (SN) als auch mit einer Dopamindepletion im Striatum und Hippokampus einhergeht³⁵⁻³⁸. Das beeinträchtigt wiederum die hippocampale Neurogenese, was ursächlich für die kognitiven Defizite in Dopamin-depletierten Tiere sein und zu den kognitiven Defiziten im humanen IPS beitragen könnte³⁹⁻⁴². Ein physisch aktiver Lebensstil verbessert dagegen Kognition, erhöht die Dopaminlevel und steigert die hippocampale Neurogenese im Dopamindepletionsmodell, so dass Lebensstilinterventionen auch bei neurodegenerativen Erkrankungen therapeutisch eingesetzt werden können^{40,43-45}. In der **Sport-MPTP-Studie** untersuchten wir, inwiefern ein veränderter Dopaminstoffwechsel die Effekte physischer Aktivität im Dopamindepletionsmodell moduliert.

2. Methodik und Material

2.1. Tiere

Die Tierstudien genehmigte die zuständige lokale Behörde, das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo, Berlin). Alle Mäuse lebten in einer Luftfeuchtigkeit und Temperatur kontrollierten Umgebung mit freiem Zugang zu Trinkwasser und Futter. Die Tiere lebten, außer den Jetlag-Tieren, in einem konstanten 12/12 Stunden (h) Hell-/Dunkelzyklus und wurden stets zufällig einer experimentellen Gruppe zugeteilt. Die C57BL/6N Mäuse bezogen wir vom

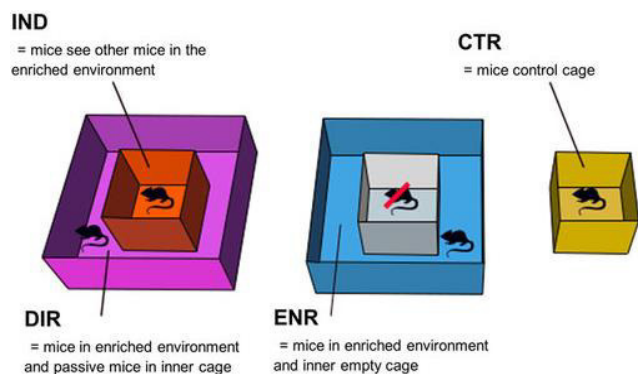
kommerziellen Anbieter Charles River und die transgenen Nestin-GFP Mäuse von der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM, Berlin). Die Nestin-GFP Mäuse mit C57Bl/6N-Hintergrund exprimieren unter der Kontrolle des Nestin-Promotors das grün fluoreszierende Protein (GFP). Das Filament Nestin ist ein Marker für neuronale Stammzellen. GFP erleichtert die Anfärbung Nestin⁺-Zellen und somit die Analyse neuronaler Stammzellen⁴⁶.

2.2. Studiendesign

2.2.1. TV-Studie: *Effekte reiner Wahrnehmung versus direkter Interaktion mit einer reizreichen Umgebung im gesunden Mausmodell.*

In einem TV-ähnlichen-Setup haben wir untersucht, ob direkte Interaktion mit einer reizreichen Umgebung notwendig ist, oder ob die visuelle, auditive und olfaktorische Wahrnehmung einer reizreichen Umgebung sowie der in dieser Umgebung lebenden Tiere ausreicht, um die adulte hippocampale Neurogenese zu stimulieren und die spatiale Kognition zu verbessern. Dazu teilten wir 97 weibliche C57Bl/6N Mäuse auf vier verschiedene Gruppen auf (DIR, IND, ENR, CTR; Abb. 1)²⁶. DIR und ENR lebten in einer reizreichen Umgebung, die aus bunten Kartons, einem Röhrensystem, variierenden Futter- und Trinkstellen bestand, die wir 2 – 3x/Woche neu anordneten. Um zwischen proliferierenden und langfristig überlebenden Zellen unterscheiden zu können, haben wir 26 Nestin-GFP Mäuse 24h nach dreimaliger 5'-Bromo-2'-desoxy-Uridin (BrdU) -Injektion am 28. Versuchstag getötet, während wir 71 C57Bl/6N-Mäuse vier Wochen nach BrdU-Inkorporation am 56. Versuchstag perfundierten. Zur Untersuchung der spatialen Kognition haben wir 41 C57Bl/6N Mäuse in der letzten Versuchswoche im MWM getestet.

Abb. 1. TV-Käfigbedingungen. Magenta (DIR): Mäuse in reizreicher Umgebung können von Mäusen im inneren Standardkäfig wahrgenommen werden. Rot (IND): Mäuse im Standardkäfig inmitten der reizreichen Umgebung. Blau (ENR): Mäuse in reizreicher Umgebung mit unbewohntem Standardkäfig im Zentrum. Gelb (CTR): Kontrolltiere im Standardkäfig ohne Konfrontation mit anderen Tieren²⁶.



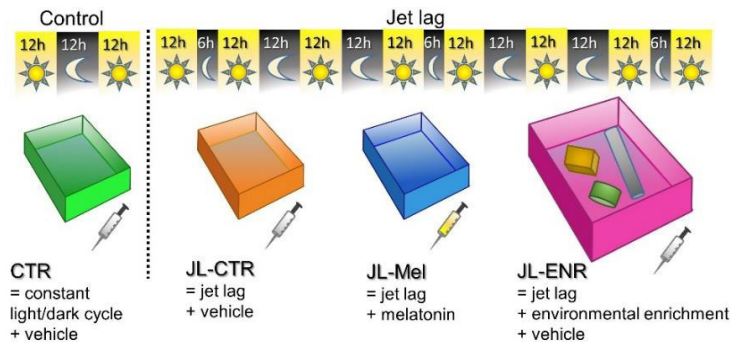
2.2.2. Jetlag-Studie: *Effekte von Melatonin und einer reizreichen Umgebung in einem Mausmodell chronischer zirkadianer Dysrhythmie.*

Um die Folgen einer Jetlag-Simulation auf die hippocampale Neurogenese und das spatiale Gedächtnis zu charakterisieren sowie die pro-neurogenen Stimuli Melatonin und die reizreiche Umgebung als therapeutische Ansätze zu untersuchen, teilten wir 150 weibliche C57Bl/6N Mäuse auf vier verschiedene Gruppen auf (Abb. 2)⁴⁷. Drei Gruppen (JL-CTR/ -Mel/ -ENR) durchliefen

drei Wochen lang Jetlag, den wir durch eine Verkürzung der Dunkelphase um sechs Stunden an jedem dritten Tag induzierten. Insgesamt durchlebten die Tiere acht Zeitverschiebungen. Die Therapie mit Melatonin (8 mg/kgKG) respektive einer reizreichen Umgebung wurde entweder direkt vor der dritten Zeitverschiebung in 68 C57Bl/6N Mäusen oder vier Tage nach der Zeitverschiebung in 52 C57Bl/6N Mäusen begonnen (Langzeit-Gruppe = LT). Der Zeitpunkt der BrdU-Injektionen, zur Markierung proliferierender Zellen, erfolgte abhängig vom Therapiebeginn entweder vor der dritten Zeitverschiebung oder zwei Tage nach der letzten Zeitverschiebung in der LT-Gruppe. Die Zellproliferation wurde 24h nach BrdU-Inkorporation in 30 Nestin-GFP Mäusen untersucht, während das Überleben von Zellen vier Wochen nach BrdU-Inkorporation in 40 C57Bl/6N Mäusen analysiert wurde. In der letzten Woche des Experiments wurde das spatiale Gedächtnis von 80 Mäusen im MWM getestet.

Abb. 2. JL-Käfigbedingungen.

Grün (CTR): Kontrolltiere mit konstantem Hell/Dunkel-Zyklus.
 Orange (JL-CTR): Jetlag-Mäuse.
 Blau (JL-Mel): Jetlag-Mäuse behandelt mit Melatonin.
 Magenta (JL-ENR): Jetlag-Mäuse in einer reizreichen Umgebung⁴⁷.



2.2.3. Sport-Diät-Studie: Effekte physischer Aktivität im HFD-Mausmodell.

Um zu untersuchen, ob die pro-kognitiven Auswirkungen physischer Aktivität im HFD-Modell durch hippokampale Neurogenese moduliert werden, teilten wir 135 weibliche C57Bl/6N Mäuse auf zwei verschiedene Versuchsläufe – präventiv und therapeutisch - auf⁴⁸. Im präventiven Ansatz erhielten je 36 sechs Wochen alte Mäuse eine Hochkalorische Diät (5.24 kcal/g; 60 % Fett, 20 % Protein, 20 % Kohlenhydrate) oder eine Kontrolldiät (3.85 kcal/g; 10 % Fett, 20 % Protein, 70 % Kohlenhydrate). Simultan zu der Diät erhielt die Hälfte dieser Tiere Zugang zu einem Laufrad (HFD-R/ CD-R), die andere verblieb ohne Laufrad (HFD-S/ CD-S). Im therapeutischen Ansatz erhielten 63 zehn Wochen alte Tiere entweder die hochkalorische (N = 36) oder die Kontrolldiät (N = 27). Von diesen erhielten nach zehn Diätwochen 32 Tiere ein Laufrad (HFD-R/ CD-R), 31 Mäuse verblieben ohne Laufrad (HFD-S/ CD-S). Die Versuchsdauer betrug in beiden Ansätzen zwölf Wochen. Sowohl in der präventiven als auch in der therapeutischen Gruppe wurde die Neurogenese histologisch untersucht oder die Kognition im MWM getestet und der „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) bestimmt. Wir kontrollierten täglich das konsumierte Futter, das Körpergewicht und kalkultierten die physische Aktivität anhand der Laufraddrehungen.

2.2.4. Sport-MPTP-Studie: Effekte physischer Aktivität im Dopamindepletionsmodell.

Zur Untersuchung der dopaminergen Regulation der adulten hippocampalen Neurogenese, sowie deren Modulation durch physische Aktivität, teilten wir 118 weibliche Nestin-GFP Mäuse zufällig auf zwei Gruppen auf⁴⁹. Der einen Gruppe injizierten wir dreimal das neurotoxische in 0.9% Kochsalzlösung (NaCl) verdünnte Opioid-derivat 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,4-Tetrahydropyridin (MPTP, 20 mg/kg). Das Toxin zerstört die dopaminergen Neurone der SN und reduziert den Dopamingehalt im Striatum und Hippokampus. Die Kontrollgruppe erhielt dreimal 0.9% NaCl intraperitoneal (i.p.). Beide Gruppen unterteilten wir in Gruppen mit Zugang zu einem Laufrad (MPTP-R/ CTR-R) und in Gruppen ohne Laufrad (MPTP-S/ CTR-S) sowie in zwei verschiedene Zeitverläufe: Eine Kurzzeitgruppe (ST), in der die Tiere zehn Laufradtage hatten, und eine Langzeitgruppe (LT) mit 28 Tagen Laufrad. Die physische Aktivität kalkulierten wir anhand der Laufraddrehungen. In der ST- und in der LT-Gruppe untersuchten wir in insgesamt 55 Mäusen die hippocampale Neurogenese histologisch nach Perfusion an Tag 16/34 und in 63 Mäusen analysierten wir die Motorik im Rotarod sowie die Gedächtnisleistung im MWM und die Genexpression sowie den Katecholamingehalt nach Perfusion an Tag 23/41.

2.3. Gewebevor und -aufbereitung

2.3.1. 5'-Bromo-2'-desoxy-Uridin Injektion

Für die histologische Quantifizierung und Charakterisierung der Neurogenese injizierten wir den Mäusen in 0.9% NaCl verdünntes BrdU i.p. (50 mg/kgKG). BrdU inkorporiert statt Thymidin in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) und markiert proliferierende Zellen.

Die in den Experimenten verwendeten Substanzen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Substanzen mit Dosis, Eigenschaften und Herstellerangabe.

Substanz	Abkürzung	Dosis/ Eigenschaften	Hersteller
1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine Hydrochloride	MPTP-HCl	20 mg/kgKG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Methylbutan	C ₁₅ H ₁₂		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
3,3'-Diaminobenzidin	DAB	0.025 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
5'-Bromo-2'-deoxyuridine	BrdU	50 mg/kgKG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
5'-Bromo-2'-desoxyuridine-Antikörper, Ratte	Anti-BrdU, rt	1:500	Bio-Rad Inc., Hercules, USA
10 ⁻⁶ M Dopamin-Lösung			Bio-Rad Inc., Hercules, USA
10 ⁻⁷ M 3,4 Dihydroxyphenylessig-Lösung	DOPAC		Bio-Rad Inc., Hercules, USA
Alexa 488, Huhn, Kaninchen, Maus		1:1000	LifeTechnologies, Carlsbad, USA
Alexa 647, Maus		1:300	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Alexa 647, Ziege		1:100	LifeTechnologies, Carlsbad, USA
Biotin-Antikörper, Ratte, Ziege	Anti-Biotin, rt, gt	1:250	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

Boratpuffer		0.1 M, pH 8.5	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Brain-derived neurotrophic factor ELISA kit	BDNF ELISA		Promega Inc., Fitchburg, USA
Chlorwasserstoff	HCl	2 N	Merck, Darmstadt, Deutschland
Control diet (D12459)	CD	3.85 kcal/g 10 % Fett	Research Diets Inc., New Brunswick, USA
Dopaminrezeptor D1a TaqMan® assay	drD1a		Applied Biosystems, Foster City, USA
Dopaminrezeptor D2 TaqMan® assay	drD2		Applied Biosystems, Foster City, USA
Dopaminrezeptor D5 TaqMan® assay	drD5		Applied Biosystems, Foster City, USA
Doublecortin-Antikörper, Ziege	Anti-DCX, gt	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Esel-Serum		10 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Extraktionspuffer (100mM Tris-HCl, 400mM NaCl, 0,1% NaN ₃ , Proteaseinhibitoren)			Bio-Rad Inc., Hercules, USA
Glial fibrillary acidic protein-Antikörper, Ziege	Anti-GFAP, gt	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase TaqMan® assay	Gapdh		Applied Biosystems, Foster City, USA
Green-fluorescent protein-Antikörper, Huhn	Anti-GFP, ck	1:250	Novus Biologicals, Littleton, USA
Green-fluorescent protein-Antikörper, Kaninchen	Anti-GFP, rb	1:250	Abcam, Cambridge, UK
High-fat diet (D12492)	HFD	5.24 kcal/g 60 % Fett	Research Diets Inc., New Brunswick, USA
High Capacity RNA-to-cDNA kit			Applied Biosystems, Foster City, USA
Homovanillinsäure-Lösung	HVA		Bio-Rad Inc., Hercules, USA
Ketamin-hydrochlorid/ Xylazine (Rompun)	Ketamin	10 %/ 2 %, 0.1ml/20g	Provet AG, Lyssach, Schweiz
Neuronal Nuclei-Antikörper, Maus	Anti-NeuN, ms	1:100	Merck-Millipore, Billerica, USA
Nickelchlorid	NiCl ₂	0.04 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nucleospin RNA/Protein Isolation Kit			Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Melatonin		8 mg/kgKG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	PFA	4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Perchlorsäure	HClO ₄	0.1 M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatpuffer	PBS	0.1 M, 7.5 pH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
ProTaq®Clear, PARAmount			Quartett GmbH, Berlin, Deutschland
Rhodamin-X-Antikörper, Ratte	Anit-RhX, rt	1:250	Dianova, Hamburg, Deutschland
Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	20 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Triton	0.1 %	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Vectastain® ABC Elite kit	ABC-Reagenz	9 µl/ml	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	0.6 %, 0.01 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.3.2. Gewebeextraktion und -zuschnitt

Zur Gewinnung von fixiertem Gewebe für die Histologie anästhesierten wir die Mäuse mit einer Überdosis Ketamin und perfundierten diese transkardial mit einer kalten phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS, 0.1 M) und kaltem 4%-Paraformaldehyd (PFA). Die freipräparierten Gehirne fixierten wir in PFA für 24h bei 4 °C und dehydrierten sie in einer 20%-Saccharoselösung. Wir froren die Gehirne bei -80 °C in Methylbutan ein, schnitten die Gehirne im Kryostat in 40 µm dicke koronare Schnitte und bewahrten diese bei 4 °C in einer Anti-Frost-Lösung auf.

Zur Gewebegewinnung für die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR), das enzymatische Immunadsorptionsverfahren (ELISA) und die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) anästhesierten wir die Mäuse mit einer Überdosis Isofluran und perfundierten sie transkardial mit kaltem PBS. Die freipräparierten Gehirne froren wir auf Trockeneis ein und lagerten sie bei -40 °C. Für die Analysen präparierten wir das Striatum (Bregma 1.1 mm – 0.1 mm), den anterioren (Bregma -1.7 mm – -2.3 mm) sowie den posterioren Hippokampus (Bregma -2.3 mm – -3.3 mm) einzeln frei. Die in der Arbeit verwendeten Geräte und Software sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte und Software mit Funktion und Herstellerangabe.

Gerät	Funktion	Hersteller
Kryostat CM 1850	Gewebeschnitte	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Leica DMR Mikroskop	Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Leica TCS SP2, Lasermikroskop	Konfokale Mikroskopie	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Multiskan™ FC Mikrotiterplatten-Photometer	ELISA, Proteinlevel-Messung	ThermoFischer Scientific Inc., Waltham, USA
Reversed-phase HPLC-ECD System, ProntoSIL. C18. SH., ECD 4100, Chromsystems	Katecholaminlevel-Messung	Bischoff Analysetechnik und -geräte GmbH, Neu-Anspach, Deutschland
Rotarod Advanced 3375-M5	Rotarod-Test	TSE systems, Chesterfield, USA
StepOne real-time PCR instrument	Polymerasekettenreaktion: Amplifizierung	Applied Biosystems, Foster City, USA
Zeiss Axio, Lichtmikroskop	Lichtmikroskopie	Zeiss, Jena, Deutschland
Software	Funktion	Hersteller
GraphPad Prism 5.1	Grafik	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Matlab R2014a, R2015b	Statistik, Grafik	MathWorks, Natick, USA
StepOne	PCR-Auswertung, C1-Methode	Applied Biosystems, Foster City, USA
SPSS, Version 19, 22, 23	Statistik	International Business Machine Corporation (IBM), Armonk, USA
Viewer3	Analyse von Verhaltenstests	Biobserve GmbH, Bonn, Deutschland

2.4. Histologie

2.4.1. Immunhistochemie

Zur Bestimmung von BrdU-inkorporierten und DCX⁺-Zellen färbten wir die koronaren Schnitte immunhistochemisch an. Das Gewebe behandelten wir mit 0.6%-Wasserstoffperoxid (H₂O₂) für

30 Minuten vor. Für weitere 30 Minuten denaturierten wir die DNA mit 2 N Chlorwasserstoff (HCl) bei 37 °C und behandelten anschließend das Gewebe mit Boratpuffer (pH 8.5, 0.1M) für 10 Minuten. Zur Antigenblockierung nutzten wir PBS⁺ (PBS, 0.1% Triton X-100, 10% Esel Serum). Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag inkubierten wir die Schnitte für zwei Stunden mit dem biotinylierten Sekundärantikörper und behandelten das Gewebe für eine Stunde mit dem ABC Elite Kit. Mit dem Chromogen 3,3'-diaminobenzidine (DAB), 0.01% H₂O₂ und 0.04% Nickelchlorid (NiCl₂) färbten wir die BrdU⁺-/ DCX⁺-Zellen an. Zwischen den einzelnen Schritten spülten wir das Gewebe mit PBS. Das Gewebe dehydrierten wir schließlich in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe, transferierten es auf Objektträger und deckelten es mit ProTaq[®]Clear ein. In jedem sechsten Schnitt quantifizierten wir die gefärbten Zellen unter dem Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Die absolute Zahl der angefärbten Zellen bestimmten wir durch sechsmalige Multiplikation.

2.4.2. Immunfluoreszenz

Zur Phänotypisierung der BrdU⁺-Zellen untersuchten wir das Gewebe auf Ko-Expression neuronaler Marker. Wir behandelten die Schnitte mit HCl bei 37 °C für 30 Minuten und für 10 Minuten mit 0.1 M Boratpuffer vor und spülten diese mit PBS⁺ für 30 Minuten zur Antigenblockierung. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag inkubierten wir die Schnitte für vier Stunden lichtgeschützt mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper. Zwischen den Schritten spülten wir die Schnitte mit PBS. Schließlich dehydrierten wir die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe, transferierten sie auf Objektträger und deckelten diese mit ProTaq[®]Clear ein. In jedem zwölften Gewebeschnitt wählten wir 50 BrdU⁺-Zellen zufällig im DG aus, die wir auf Ko-Expression bei 40-facher und 63-facher Vergrößerung durch die Bildung von Z-Stapeln (1 µm) in der konfokalen Laser-Mikroskopie untersuchten. Zur Schätzung eines Zelltyps übertrugen wir den prozentualen Anteil auf die Gesamtzahl der BrdU⁺-Zellen.

2.5. Molekularbiologie

2.5.1. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die Genexpression der anterioren Hippokampi analysierten wir mit der qPCR. Dazu extrahierten wir die Boten-Ribonukleinsäuren (mRNA) mit dem Nucleospin RNA/Protein Isolierungs Kit. Mit dem „High Capacity RNA-to-cDNA Kit“ synthetisierten wir die komplementäre DNA (cDNA) und amplifizierten diese mit dem „TaqMan[®] Fast Advanced Master Mix“ und den Assays drD1a, drD2, drD5 und Gapdh im StepOne[®] real-time PCR Instrument. Gapdh diente als interne Kontrolle, um die relative Genexpression mit der komparativen C₁-Methode ($\Delta\Delta C_t$) in der Software StepOne[®] zu normieren und Expressionslevel zu kalkulieren.

2.5.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Mit der HPLC bestimmten wir den Gehalt von Dopamin und dessen Metaboliten 3,4-Dihydroxyphenylessig (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) im Striatum und im posterioren Hippokampus. Die Proben homogenisierten wir mit Ultraschall in 0.1 M Perchlorsäure. In 60 µl des Homogenats maßen wir die Proteinlevel⁵⁰. Wir zentrifugierten die Proben (13.000 Upm) und bestimmten die Katecholaminlevel mit dem Umkehrphase-HPLC-ECD System. Standardisierte Dopamin-, DOPAC- und HVA-Lösungen fungierten als Referenzen. Mit dem Chromatogramm und den Proteinproben kalkultierten wir die Katecholamin-Konzentration. Den Dopamin-Umsatz bestimmten wir über das Verhältnis von Dopamin zu seinen Metaboliten.

2.5.3. Enzymatisches Immunadsorptionsverfahren

Die Level des Neurotrophins BDNF bestimmten wir mit ELISA. Wir wogen die unfixierten Hippokampi, homogenisierten sie unter Ultraschall mit einem Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 0,1% NaN₃, Proteaseinhibitoren) und zentrifugierten sie für zehn Minuten bei 4 °C (13.000 Upm). Die BDNF-Level bestimmten wir unter Adaption der fluormetrischen Methode^{51,52}.

2.6. Verhaltenstests

2.6.1. Rotarod

Um auszuschließen, dass die Dopamindepletion die Motorik der MPTP-Tiere beeinflusste und sich auf den MWM auswirkte, testeten wir die Mäuse im Rotarod, bestehend aus einem motorisierten Zylinder mit Boden und Trennwänden⁵³. Nach zweitägiger Habituation testeten wir die Mäuse auf dem rotierenden Zylinder und maßen die Latenz bis zum Herunterfallen für maximal fünf Minuten. Die Startgeschwindigkeit lag bei vier Runden pro Minute, die wir sukzessive auf 40 Runden pro Minute für mindestens 60 Sekunden erhöhten.

2.6.2. Morris-Wasserlabyrinth

Wir testeten das spatiale Gedächtnis und die Gedächtnisflexibilität in einer modifizierten Version des MWM¹⁷. Für fünf konsekutive Tage trainierten wir die Mäuse mit Hilfe von visuellen Hinweisen zu einer Plattform zu navigieren, die in einem zirkulären Tank (1.2 m Durchmesser) 1 cm unter der Oberfläche im opaken Wasser (20 ± 1°C) versteckt lag. Die Mäuse setzten wir sechsmal täglich für maximal 120 Sekunden ins Wasser mit mindestens 30 Minuten Pause zwischen den Trials. An Tag 4 positionierten wir die Plattform im gegenüberliegenden Quadranten neu (Abb. 4). Die Latenz bis zum Finden des Ziels, die Strecke, die Geschwindigkeit und das Kreuzen des Plattformbereichs wurden automatisch vom Programm Viewer³ analysiert. Die Strecke wurde automatisch in XY-Koordinaten codiert, die wir in einem Matlab-Algorithmus einer Schwimmstrategie zuordneten. Die Strategien teilten wir in spatiale Hippokampus-abhängige

Strategien oder Hippokampus-unabhängige Strategien ein. „Gezielte Suche“, „Fokale Suche“ und „Direktes Schwimmen“ galten als spatial, während die verbliebenen als nicht-spatial galten¹⁷. Die Lokalpräferenz wurde in Wärmebildern abhängig von der Koordinatenhäufigkeit dargestellt.

2.7. Statistische Analyse und Darstellung

Wir implementierten die Daten in SPSS und testeten den experimentellen Einfluss auf metrische Variablen mit oneway-, twoway- oder repeated-measures-ANOVA. Bei statistischer Signifikanz – die bei $p \leq 0.05$ lag – führten wir Gruppenvergleiche mit Post-hoc-Tests durch. Der ausgewählte Test hing von der Varianz und N ab. Nominale Variablen testeten wir mit dem χ^2 -Unabhängigkeits-Test auf Abhängigkeiten. Die Grafen erstellten wir mit GraphPad Prism 5.1 oder Matlab. Metrische Daten stellen wir als Mittelwerte \pm SEM oder als Tukey-Style Boxplots mit Median und einer Reichweite von der 25. bis zur 75. Perzentile dar.

3. Ergebnisse

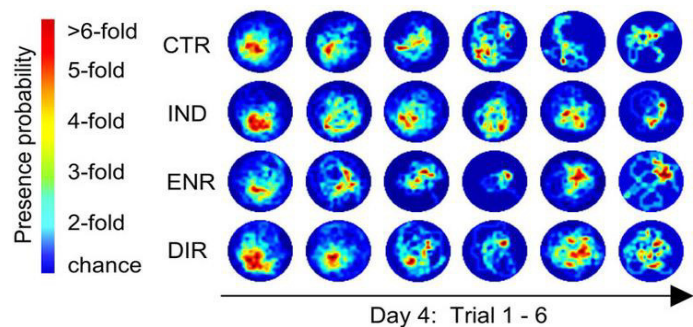
3.1. TV-Studie: *Direkte Interaktion mit einer reizreichen Umgebung ist notwendig, um die adulte hippocampale Neurogenese zu erhöhen und spatiale Kognition zu verbessern.*

Den Einfluss reiner Wahrnehmung einer reizreichen Umgebung versus (vs) direkter Interaktion mit einer reizreichen Umgebung auf die adulte hippocampale Neurogenese untersuchten wir histologisch mit der BrdU-Inkorporations-Methode. Vier Wochen nach BrdU-Gabe zeigte sich der charakteristische pro-neurogene Effekt einer reizreichen Umgebung auf die Neurogenese in DIR und ENR. Beide Gruppen zeigten eine erhöhte Anzahl von überlebenden reifen BrdU⁺/NeuN⁺-Neuronen im DG ($F_{3,25} = 11.673$, $p < 0.001$; ENR vs CTR, $p < 0.001$; DIR vs CTR, $p = 0.001$). Die indirekte Konfrontation von IND mit der reizreichen Umgebung und der in dieser Umgebung lebenden Tiere erhöhte dagegen die BrdU⁺/NeuN⁺-Neuronenzahl nicht (IND vs CTR, $p = 0.401$). Die hippocampale Zellproliferation bestimmten wir 24h nach BrdU-Injektion in Nestin-GFP Mäusen. Jedoch beeinflussten weder die direkte noch die indirekte Konfrontation mit einer reizreichen Umgebung die neuronale Proliferation ($F_{3,22} = 0.391$, $p = 0.761$). Ebenso blieben die Subpopulationen der NPCs unverändert (Nestin⁺/GFAP⁺-Typ-1: $F_{3,17} = 0.730$, $p = 0.548$; Nestin⁺-Typ-2a: $F_{3,21} = 0.467$, $p = 0.709$; Nestin⁺/DCX⁺-Typ-2b: $F_{3,21} = 0.704$, $p = 0.560$; DCX⁺-Typ-3: $F_{3,21} = 0.271$, $p = 0.846$).

Die spatiale Kognition der Tiere testeten wir im MWM. Alle Gruppen starteten unter denselben Ausgangsbedingungen und zeigten keine Unterschiede während des ersten Trials ($F_{3,37} = 0.603$, $p = 0.617$). In der Akquisitionsphase lernten alle Tiere die Plattformposition und zeigten keine Häufigkeitsunterschiede beim Kreuzen der vorherigen Plattformposition im ersten Trial an Tag 4 ($F_{3,37} = 0.216$, $p = 0.885$). Die reizreiche Umgebung hatte den erwarteten positiven Effekt

auf die spatiale Kognition, sodass ENR eine durchschnittlich kürzere Strecke zur Plattform als CTR über die fünf Testtage schwamm ($F_{3,241} = 10.343$, $p < 0.001$; ENR vs CTR, $p = 0.030$). Dieser Effekt war am Ende der Akquisitionsphase an Tag 3 besonders ausgeprägt ($F_{3,241} = 6.920$, $p < 0.001$; ENR vs CTR, $p = 0.031$). Überraschend konnte DIR nicht von der reizreichen Umgebung profitieren und zeigte keine bessere Leistung als CTR, weder insgesamt (DIR vs CTR, $p = 0.999$), noch an einzelnen Tagen (Tag 1: $p = 0.135$; Tag 2: $p = 0.154$; Tag 3: $p = 0.961$; Tag 4: $p = 0.971$; Tag 5: $p = 1.000$). An Tag 2 benötigte DIR sogar eine längere Schwimmstrecke als ENR ($F_{3,242} = 6.248$, $p < 0.001$; ENR vs DIR, $p = 0.050$). Ebenso überraschte, dass IND eine längere Strecke zur Plattform benötigte als CTR (IND vs CTR, $p = 0.036$). Der Leistungsunterschied zwischen den beiden Gruppen wurde besonders an Tag 2 (IND vs CTR, $p = 0.012$) und während der Umlernungsphase an Tag 4 und 5 deutlich ($F_{3,242} = 7.549$, $p < 0.001$; IND vs CTR, $p = 0.032$). In der qualitativen Analyse des MWM zeigte die Bestimmung der Suchstrategien zudem, dass IND weniger effiziente nicht-spatiale Strategien präferierte ($\chi^2(3) = 34.276$, $p < 0.001$; IND (53.8 %), CTR (43.9 %), DIR (42.1 %), ENR (35.4 %)). ENR dagegen wählte seltener Perseveration – eine Strategie, in der die alte Plattformposition weiter im Fokus steht – als Suchstrategie ($\chi^2(21) = 44.782$, $p = 0.002$; IND (31.3 %), CTR (28.3 %), DIR (15.3 %), ENR (6.7 %)). Das verdeutlicht das flexiblere Umlernen von ENR im Gruppenvergleich. Darüber hinaus visualisierten wir die Lokalpräferenzen der Gruppen an Tag 4 von Trial 1 bis Trial 6. Abbildung 3 zeigt wie ENR ab Trial 3 eine neue Zielpräferenz entwickelte, während CTR, IND und DIR erst am Ende von Tag 4 eine neue Präferenz ausbildeten.

Abb. 3. Aufenthaltswahrscheinlichkeit im MWM. Die Wärmebilder stellen die Entwicklung der Lokalpräferenz nach der Neupositionierung der Plattform an Tag 4 dar. Der Farbumschlag von rot (6-fache Wahrscheinlichkeit) nach blau (Zufall) stellt die abnehmende Präsenzwahrscheinlichkeit dar²⁶.



In Zusammenschau der morphologischen und funktionellen Daten zeigte sich, dass die bekannte positive Wirkung einer reizreichen Umgebung auf die adulte hippocampale Neurogenese und spatiale Kognition nur durch die direkte Interaktion mit der reizreichen Umgebung induziert werden konnte. Die alleinige Wahrnehmung war hingegen unzureichend. Die indirekte Exposition korrelierte sogar mit einer schlechteren Leistung der Gedächtniskonsolidierung und -flexibilität. Folglich ist die direkte Interaktion mit einer reizreichen Umgebung notwendig, um das pro-neurogene und pro-kognitive Potenzial einer reizreichen Umgebung zu induzieren.

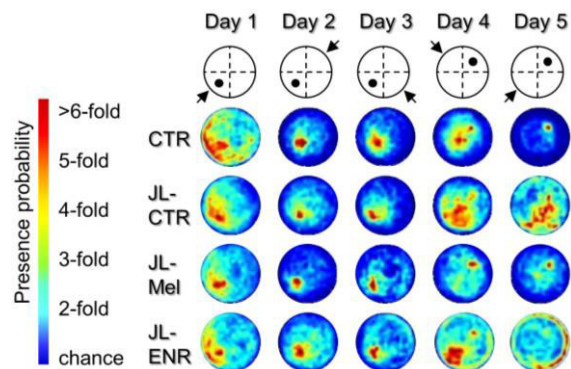
3.2. Jetlag-Studie: *Melatonin beugt den neuronalen und kognitiven Defiziten chronischer zirkadianer Dysrhythmie vor.*

Den Einfluss von zirkadianer Dysrhythmie sowie von Melatonin und einer reizreichen Umgebung auf die adulte hippocampale Neurogenese untersuchten wir histologisch mit der BrdU-Inkorporations-Methode. 24h nach BrdU-Gabe bestimmten wir die Proliferationsrate der NPCs im DG, die durch zirkadiane Dysrhythmie um 36 % reduziert wurde ($F_{3,23} = 4.582$, $p < 0.01$; CTR vs JL-CTR, $p = 0.029$). Eine verantwortliche Subpopulation der NPCs war jedoch nicht detektierbar (Nestin⁺/GFAP⁺-Typ-1: -40 %, $F_{3,23} = 0.938$, $p = 0.438$; Nestin⁺-Typ-2a: -37 %, $F_{3,23} = 1.527$, $p = 0.234$; Nestin⁺/DCX⁺-Typ-2b: -73 %, $F_{3,23} = 1.584$, $p = 0.220$; DCX⁺-Typ-3: +4 %, $F_{3,23} = 0.392$, $p = 0.760$). Die verminderte Proliferationsrate konnte sowohl durch Melatonin als auch durch eine reizreiche Umgebung kompensiert werden ($F_{3,23} = 4.582$, $p = 0.012$; CTR vs JL-Mel, $p = 1.000$; CTR vs JL-ENR, $p = 1.000$; JL-CTR vs JL-Mel, $p = 0.035$; JL-CTR vs JL-ENR, $p = 0.047$). Im Gegensatz zur Proliferation blieb das Überleben hippocampaler Neurone von zirkadianer Dysrhythmie vier Wochen nach BrdU-Gabe sowohl wenige Tage als auch mehrere Wochen nach der letzten Zeitverschiebung unbeeinflusst ($F_{3,19} = 32.066$, $p < 0.001$; CTR vs JL-CTR, $p = 0.955$; $F_{3,16} = 5.426$, $p = 0.009$; LT-CTR vs LT-JL-CTR, $p = 0.508$).

Um die spatiale Kognition der Mäuse zu untersuchen, testeten wir die Tiere im MWM. Alle Tiere erlernten die Aufgabe und erbrachten eine ähnliche Schwimmleistung über die gesamte Akquisitionsphase ($F_{3,276} = 1.873$, $p = 0.134$) und kreuzten ähnlich häufig die alte Plattformzone im ersten Trial an Tag 4 ($F_{3,44} = 0.872$, $p = 0.463$). Über den gesamten MWM zeigte JL-CTR jedoch eine um 23 % schlechtere Schwimmleistung als CTR ($F_{3,274} = 6.540$, $p < 0.001$; CTR vs JL-CTR, $p = 0.018$). Diesem Leistungsabfall konnte sowohl durch Melatonin als auch durch eine reizreiche Umgebung vorgebeugt werden (CTR vs JL-Mel, $p = 0.986$; CTR vs JL-ENR, $p = 0.060$). Betrachteten wir allein die Phase nach dem Umstellen der Plattform, zeigte sich, dass nicht nur JL-CTR eine längere Strecke als CTR zum Ziel benötigte, sondern auch JL-ENR ($F_{3,281} = 7.893$, $p < 0.000$; CTR vs JL-CTR, $p = 0.001$; CTR vs JL-ENR, $p = 0.009$). Im Gegensatz dazu und trotz Jetlag zeigte JL-Mel auch in der Umlernungsphase eine bessere Leistung als JL-CTR und unterschied sich nicht von der Kontrollgruppe (CTR vs JL-Mel, $p = 1.000$; JL-CTR vs JL-Mel, $p = 0.005$). In der qualitativen Analyse des MWMs zeigte sich, dass JL-CTR und JL-ENR weniger effiziente Suchstrategien nutzten um zur Plattform zu gelangen. In CTR war der Anteil von Thigmotaxis, einer ineffizienten Suchstrategie, in der sich die Tiere im äußeren Zirkel des Tanks befinden, gerade einmal 2.8 %, in JL-CTR dagegen 10.6 % und in JL-ENR 14.3 % ($\chi^2 = 62.189$, $p = 0.001$). Die „falsche“ Wahl der Suchstrategie trug zur schlechteren Leistung von JL-CTR und JL-ENR im MWM bei. Die Wärmebilder verdeutlichen die Überlegenheit von JL-Mel und CTR

(Abb. 4). Beiden Gruppen gelang es eine Präferenz für das neue Ziel zu entwickeln, während JL-CTR und JL-ENR bis zum Testende keine klare neue Präferenz ausbildeten.

Abb. 4. Aufenthaltswahrscheinlichkeit im MWM. Die Wärmebilder stellen die Entwicklung der Lokalpräferenz über den gesamten MWM von Tag 1 bis Tag 5 dar. Der Farbumschlag von rot (6-fache Wahrscheinlichkeit) nach blau (Zufall) stellt die abnehmende Präsenzwahrscheinlichkeit dar⁴⁷.



Im Gegensatz zu den Gruppen, die kurz nach der letzten Zeitverschiebung im MWM getestet wurden, hob sich der Einfluss von Jetlag auf die kognitive Performance vier Wochen nach der letzten Zeitverschiebung fast vollständig wieder auf. Zwischen den LT-Gruppen ließen sich keine Unterschiede bezüglich der Schwimmstrecke weder insgesamt noch in der Umlernungsphase, detektieren ($F_{3,173} = 1.432$, $p = 0.235$; $F_{3,187} = 2.185$, $p = 0.091$), jedoch war die Wahrscheinlichkeit für ineffiziente nicht-spatiale Suchstrategien in LT-JL-CTR weiterhin erhöht ($\chi^2 = 48.536$, $p = 0.001$; LT-CTR (1.3 %), LT-JL-CTR (10.1 %), LT-JL-Mel (8.4 %), LT-JL-ENR (6.8 %)).

In Zusammenschau der morphologischen und funktionellen Daten zeigte sich, dass zirkadiane Dysrhythmie vor allem die neuronale Regeneration im DG verminderte und die Gedächtnisflexibilität einschränkte. Während eine reizreiche Umgebung nur den neuronalen Veränderungen entgegenwirkte, glich Melatonin sowohl die neuronalen als auch die kognitiven Defizite aus.

3.3. Sport-Diät-Studie: *Physische Aktivität beugt kognitiven Defiziten im HFD-Modell vor und moduliert die adulte hippocampale Neurogenese.*

Den Einfluss von HFD und Aktivität auf die adulte hippocampale Neurogenese haben wir histologisch zwölf Wochen nach BrdU-Inkorporation durch die Analyse reifer BrdU⁺/NeuN⁺-Neurone und unreifer neuronaler DCX⁺-Zellen untersucht. HFD bewirkte in der präventiven Gruppe vor allem eine Verringerung unreifer DCX⁺-Neurone ($F_{1,30} = 14.034$, $p < 0.01$). Dagegen blieb die Anzahl DCX⁺-Neurone in der therapeutischen Gruppe unverändert und HFD beeinflusste stattdessen die Anzahl reifer BrdU⁺/NeuN⁺-Neurone ($F_{1,27} = 7.964$, $p < 0.01$). Physische Aktivität erhöhte die Anzahl reifer hippocampaler BrdU⁺/NeuN⁺-Neurone sowohl in der präventiven als auch in der therapeutischen Gruppe ($F_{1,30} = 23.725$, $p < 0.001$; $F_{1,27} = 7.734$, $p < 0.05$). Der positive Effekt von physischer Aktivität wirkte sich jedoch nur in der therapeutischen Gruppe auf die Anzahl unreifer DCX⁺-Neurone unabhängig von der Diät aus ($F_{1,27} = 79.624$, $p < 0.001$).

Ein bekannter Modulationsfaktor der adulten hippocampalen Neurogenese ist das Neurotrophin BDNF. Allerdings veränderten weder eine Diätform noch Aktivität die im ELISA gemessenen BDNF-Level (Präventiv: $F_{3,25} = 0.804$, $p > 0.05$; Therapeutisch: $F_{3,36} = 1.420$, $p > 0.05$), so dass BDNF die beobachteten neuronalen Veränderungen zum Messzeitpunkt nicht modulierte.

Die spatiale Kognition der Mäuse testeten wir im MWM. Alle Gruppen lernten in der Akquisitionsphase zur Plattform zu navigieren, was sich in einer Abnahme der Strecke zum Ziel widerspiegelte (Präventiv: $F_{2,56} = 35.649$, $p < 0.001$; Therapeutisch: $F_{2,56} = 41.040$, $p < 0.001$). Während die Diätform die Leistung in der Akquisitionsphase nicht beeinflusste, verbesserte physische Aktivität das Lernvermögen in der präventiven Gruppe ($F_{2,56} = 3.320$, $p < 0.05$), was sich besonders als kürzere Schwimmpfadlänge an Tag 2 präsentierte (R-Gruppe vs S-Gruppe, $p < 0.01$). Die Gedächtnisflexibilität wurde durch eine Neupositionierung der Plattform an Tag 4 getestet. Von Tag 4 bis Tag 5 zeigte HFD-S im Vergleich zu den Kontrollen eine längere Schwimmstrecke zur Plattform ($F_{1,28} = 4.458$, $p < 0.05$; HFD-S vs CD-S, $p < 0.05$). Dieser Effekt wurde besonders an Tag 4 deutlich (HFD-S vs CD-S, $p < 0.01$). Sowohl über die gesamte Umlernungsphase als auch an Tag 4 konnte der Beeinträchtigung der Gedächtnisflexibilität jedoch durch simultane physische Aktivität vorgebeugt werden ($F_{1,28} = 6.995$, $p < 0.05$; HFD-S vs HFD-R, $p < 0.01$). Im Gegensatz zur präventiven Gruppe veränderten weder die Diätform noch physische Aktivität die Schwimmstrecke zum Ziel in der therapeutischen Gruppe.

In Zusammenschau der morphologischen und funktionellen Daten zeigte sich, dass HFD sich vor allem kurzfristig auf die unreifen Neurone und die Gedächtnisflexibilität auswirkte. Physische Aktivität konnte diesem negativen Effekt auf die Neurogenese über Modulation der reifen Neurone entgegenwirken und die Defizite in der spatialen Kognition ausgleichen.

3.4. Sport-MPTP-Studie: *Physische Aktivität vermindert kurzfristig die neuronalen und kognitiven Folgen von MPTP, aber wirkt sich nur langfristig positiv auf den Dopaminstoffwechsel aus.*

Den Einfluss von Dopamindepletion und physischer Aktivität auf die adulte hippocampale Neurogenese untersuchten wir mit der BrdU-Inkorporations-Methode und bestimmten die BrdU⁺-Zellen im DG. In der ST-Gruppe verringerte die MPTP-Behandlung die Anzahl der BrdU⁺/Nestin⁺-Typ-1-NPCs ($F_{1,20} = 9.411$, $p < 0.01$). Im Gegensatz dazu förderte physische Aktivität die hippocampale Neurogenese und steigerte die Anzahl BrdU⁺/Nestin⁺-Typ-1- und BrdU⁺/DCX⁺-Typ-3-Zellen ($F_{1,20} = 12.21$, $p < 0.01$; $F_{1,19} = 25.034$, $p < 0.001$) sowie die Anzahl reifer BrdU⁺/NeuN⁺-Neurone ($F_{1,20} = 30.36$, $p < 0.001$). In der LT-Gruppe zeigte MPTP keinen zellulären Effekt, während Aktivität die Anzahl unreifer BrdU⁺/DCX⁺-Typ-3- und reifer BrdU⁺/NeuN⁺-Neurone erhöhte ($F_{1,27} = 17.668$, $p < 0.001$; $F_{1,27} = 80.25$, $p < 0.001$).

In der HPLC untersuchten wir den Gehalt von Dopamin und seiner Metabolite DOPAC und HVA im Striatum und Hippokampus. In der ST- wie auch in der LT-Gruppe zeigte sich, dass MPTP den striatalen Dopamin- ($F_{1,24} = 38.226$, $p < 0.001$; $F_{1,26} = 105.916$, $p < 0.001$), und DOPAC-Anteil verringerte ($F_{1,24} = 5.743$, $p < 0.05$; $F_{1,26} = 23.537$, $p < 0.001$) und parallel den Dopaminumsatz ((DOPAC + HVA) /Dopamin) unabhängig von der Aktivität der Tiere steigerte ($F_{1,24} = 34.041$, $p < 0.001$; $F_{1,26} = 76.539$, $p < 0.001$). Auch der hippokampale Dopaminstoffwechsel wurde durch MPTP beeinflusst. In der ST-Gruppe erhöhte MPTP sowohl den hippokampalen HVA-Gehalt ($F_{1,25} = 14.213$, $p < 0.001$) als auch den Dopamin-Umsatz ($F_{1,25} = 5.272$, $p < 0.05$), der ebenso durch Aktivität erhöht wurde ($F_{1,25} = 5.722$, $p < 0.05$). In der LT-Gruppe dagegen war das hippokampale Dopamin reduziert ($F_{1,26} = 26.081$, $p < 0.001$) wie auch DOPAC und HVA ($F_{1,26} = 8.781$, $p < 0.01$; $F_{1,26} = 8.238$, $p < 0.01$) bei gleichzeitig erhöhtem Dopaminumsatz ($F_{1,26} = 7.916$, $p < 0.01$). Im Gegensatz dazu trat kein erhöhter Dopaminumsatz in der physisch aktiven Gruppe LT-MPTP-R auf. Parallel zum MPTP induzierten hippokampalen Dopamindefizit zeigte sich eine Hochregulation der Dopaminrezeptoren drD1 und drD5 im DG der ST-MPTP-Mäuse. Diese exprimierten vermehrt drD1 (MPTP-S: 2.2 ± 0.4 -fache Erhöhung, MPTP-R: 2.7 ± 0.5 -fache Erhöhung; $F_{1,16} = 9.676$, $p < 0.01$) und drD5 (MPTP-S: 1.5 ± 0.3 -fache Erhöhung, MPTP-R: 1.4 ± 0.3 -fache Erhöhung; $F_{1,16} = 4.854$, $p < 0.05$). Aktivität veränderte dagegen die mRNA-Level nicht und in der LT-Gruppe beeinflussten weder MPTP noch Aktivität die Genexpression.

Um festzustellen, ob MPTP die Motorik der Tiere, und damit die Tests beeinflusste, testeten wir die Tiere im Rotarod. Trotz neurotoxischer Wirkung auf die SN schränkte MPTP die Motorik nicht ein und änderte die Latenz bis zum Herunterfallen vom Zylinder nicht ($t_{196} = 0.7514$, $p > 0.05$). Allerdings zeigten die MPTP-Tiere insgesamt weniger physische Aktivität im Laufrad (ST: $t_{102} = 2.566$, $p < 0.05$; LT: $t_{345} = 2.062$, $p < 0.05$).

Die spatiale Kognition testeten wir in einem viertägigen MWM-Paradigma. An den ersten drei Tagen wurde die Lernfähigkeit getestet und an Tag 4 nach Plattformentfernung die Gedächtnisleistung in einem Testtrial mit Messung der Zeit im ehemaligen Zielquadranten untersucht. Alle Gruppen lernten in den ersten drei Tagen zum Ziel zu navigieren, sodass sich eine Abnahme der Schwimmstrecke zeigte (ST: $F_{2,56} = 70.824$, $p < 0.001$; LT: $F_{2,54} = 81.46$, $p < 0.001$). An Tag 1 zeigte sich ein Trend in ST-MPTP-S einen längeren Weg zum Ziel zurückzulegen ($F_{2,56} = 4.9$, $p < 0.05$; MPTP-S vs CTR-S, $p = 0.055$). An Tag 3 zeigte die Gruppe sogar eine signifikant schlechtere Schwimmleistung ($p < 0.05$), der jedoch durch Aktivität vorgebeugt werden konnte. Im Gegensatz zur ST-Gruppe waren die LT-MPTP-Gruppen uneingeschränkt lernfähig. Während des Testtrials an Tag 4 zeigte sich in allen ST-Gruppen eine klare Präferenz für den vorherigen Zielquadranten ($F_{3,84} = 5.504$, $p < 0.01$). Die LT-MPTP-Tiere verbrachten

dagegen im Testtrial weniger Zeit im vorherigen Zielquadranten ($F_{3,81} = 4.498$, $p < 0.01$; MPTP vs CTR, $p < 0.05$). Physische Aktivität beeinflusste die Leistung der LT-Gruppen im MWM nicht. Zusammenfassend zeigte sich, dass MPTP vor allem kurzfristig die neuronale Regeneration im Hippokampus verminderte, den Dopaminumsatz steigerte und die Lernfähigkeit störte. Langfristig bestand ein striatales und hippocampales Dopamindefizit mit erhöhtem Dopaminumsatz und kognitiv zeigte sich eine gestörte Gedächtnisleistung. Die kurzfristigen neuronalen und kognitiven Folgen konnten durch Aktivität teilweise kompensiert werden. Auf den Dopaminstoffwechsel hatte Aktivität jedoch nur langfristig einen Einfluss mit Reduktion des Dopaminumsatzes.

4. Diskussion

In den vier Studien demonstrierten wir, dass Lebensstilinterventionen die adulte hippocampale Neurogenese und die hippocampus-abhängige spatiale Kognition positiv beeinflussen können. Die konkreten Auswirkungen von Lebensstilinterventionen auf die zelluläre, molekularbiologische und kognitive Ebene fallen bezüglich des neurogenen und kognitiven Potenzials in Abhängigkeit vom zugrundeliegenden neurodegenerativen Prozess jedoch unterschiedlich aus.

Die TV-Studie zeigte, dass das pro-neurogene und -kognitive Potenzial einer reizreichen Umgebung nur durch direkte Interaktion mit dieser – ähnlich einem aktiven Lebensstil – induziert werden kann. Die indirekte Konfrontation mit einer reizreichen Umgebung – ähnlich einem passiven Lebensstil – oder mit Tieren kann sogar zu einer verschlechterten Kognition, wie in IND, führen oder die positiven Effekte einer reizreichen Umgebung, wie in DIR, vermindern. Die Resultate sind vereinbar mit einer Studie von 1975, in der Ratten, die andere Ratten in einer reizreichen Umgebung beobachten konnten, weder ein erhöhtes Gehirngewicht noch verbesserte Exploration zeigten⁵⁴. 1963 wurde zudem nachgewiesen, dass alleinige passive Bewegung in einer visuell stimulierenden Umgebung die visuell-spatiale-Diskrimination nicht verbessern kann⁵⁵.

Bewegungsarmut und die passive Stimulation über Bildschirme sind Kennzeichen eines passiven Lebensstils, der mit erhöhter Morbidität und Mortalität assoziiert ist^{56–58}. Diesen Lebensstil repräsentierte IND und verdeutlichte, dass Passivität sich nicht pro-neurogen auf die hippocampale Neurogenese auswirkt und die spatiale Kognition sogar nachteilig beeinflussen kann.

Die Jetlag-Studie zeigte, dass zirkadiane Dysrhythmie sich negativ auf die adulte Neurogenese auswirkt. Im Vergleich zu früheren Studien stellten wir fest, dass vor allem die neurale Regeneration in Form einer gestörten Zellproliferation betroffen ist und zusätzlich die spatiale Kognition eingeschränkt wird^{27,28}. Die verminderte Regeneration der hippocampalen Neurone trägt durch die limitierte neurogene Reserve zu den beobachteten kognitiven Defiziten bei⁵⁹. Melatonin beugt zwar den neurogenen und kognitiven Defiziten vor, dessen vollständiges

neurogenes Potenzial kann unter zirkadianer Dysrhythmie jedoch nicht induziert werden, wie sich an dem fehlenden bekannten pro-neurogenen Effekt auf reife Neurone zeigte^{24,60}. Im Gegensatz zu Melatonin, wirkt ein aktiver Lebensstil in einer reizreichen Umgebung nur den Konsequenzen von zirkadianer Dysrhythmie auf zellulärer Ebene entgegen. Eine Erklärung könnte sein, dass eine reizreiche Umgebung vor allem das Überleben reifer Neurone positiv beeinflusst, zirkadiane Dysrhythmie jedoch vor allem die Zellregeneration stört. Eine effektive Therapie zirkadianer Dysrhythmie würde nicht nur Vielfliegern und Schichtarbeitern nützen, sondern auch Unfällen und Unglücken, wie der Katastrophe von Tschernobyl, vorbeugen⁶¹. Lebensstilinterventionen scheinen sich – im Gegensatz zu Melatonin – dafür jedoch nur limitiert zu eignen.

Das hier verwendete experimentelle Paradigma wird genutzt, um „Jetlag“ durch Manipulation der Hell-/Dunkelphasen in Tieren und Menschen zu simulieren^{27,28,62,63}. Einschränkungen sind, dass die Tiere keiner erhöhten Strahlung wie im Flugzeug ausgesetzt sind und nicht auszuschließen ist, dass andere Schlafstörungen die Ergebnisse beeinflusst haben könnten. Allerdings beugten wir Schlafdeprivation und -fragmentierung durch die alleinige Kürzung der Dunkelphase vor.

In unserer Sport-Diät-Studie repräsentierte die präventive Gruppe eine in der Adoleszenz begonnene HFD, während in der therapeutischen Gruppe erst im Erwachsenenalter die HFD begonnen wurde. Wir zeigten, dass die in der Adoleszenz initiierte HFD die Gedächtnisflexibilität einschränkte. Die limitierte Gedächtnisflexibilität ging dabei mit einem Verlust DCX⁺-Neuronen einher. Physische Aktivität konnte jedoch sowohl den zellulären als auch den kognitiven Defiziten entgegenwirken. Unsere Ergebnisse sind vergleichbar mit denen einer früheren Studie, die ebenfalls eine verminderte Neurogenese und schlechtere Gedächtnisleistung in Mäusen nachweisen konnte, die in der Adoleszenz eine HFD bekamen, jedoch nicht in Mäusen, die erst im Erwachsenenalter eine HFD erhielten³⁰. Ob Übergewicht in der Adoleszenz auch zu einem erhöhten Risiko für Demenz im Menschen führt, steht weiterhin zur Diskussion⁶⁴. Unsere Studie unterstützt jedoch die Hinweise darauf, dass die Adoleszenz eine vulnerable Phase ist, in der der Konsum einer HFD zu kognitiven Defiziten im Erwachsenenalter führen kann. Diesen Konsequenzen kann jedoch durch erhöhte physische Aktivität entgegengewirkt werden.

Unsere Sport-MPTP-Studie zeigte, dass Dopamindepletion kurzzeitig zu verminderter neuraler Regeneration und Lernfähigkeit führt und langfristig die spatiale Kognition einschränkt. Damit ergänzten wir Studien, die bereits eine veränderte neurale Zellproliferation in MPTP-behandelten Tieren nachweisen konnten^{65,66}. Die physisch aktiven Mäuse zeigten vermehrt fortgeschrittene neuronale Vorläuferzellen und glichen den kognitiven Leistungsabfall der MPTP-Tiere wieder aus. Diese Resultate indizieren, dass Aktivität die neuronale Reifung und Differenzierung beschleunigte und die schneller heranreifenden Neuronen zu einer besseren hippocampus-

abhängigen spatialen Kognition beitragen konnten. Sowohl in der Kurzzeit- als auch in der Langzeitgruppe kam es nach MPTP-Behandlung bei reduziertem Dopamingehalt zu einem verstärkten Dopaminumsatz und kompensatorisch in der Kurzzeitgruppe auch zu einer Hochregulation der exzitatorischen Dopaminrezeptoren. Im Gegensatz zu vorherigen Studien hatte physische Aktivität keinen restaurativen Effekt auf die Dopaminkonzentration. Stattdessen beschleunigte physische Aktivität den Dopaminumsatz. Möglicherweise wird dem Verlust neuraler Zellen entgegengewirkt, in dem vermehrt Dopamin in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird und die Anzahl der Dopaminrezeptoren erhöht wird. Insgesamt konnte Aktivität den MPTP-Effekten auf neuronaler, molekularbiologischer und kognitiver Ebene zumindest teilweise entgegenwirken. Menschen erkranken immer öfter an neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson. Ein Ansatz den körperlichen und kognitiven Konsequenzen vorzubeugen sind Lebensstilinterventionen. Dabei verdeutlichte unsere Studie jedoch, dass Lebensstilinterventionen wie physische Aktivität unterstützend wirken können, als alleinige Intervention jedoch nicht alle Folgen ausgleichen können.

Derzeit sind kontrollierte Experimente über adulte Neurogenese nur tierexperimentell realisierbar, dennoch ist Vorsicht geboten Resultate aus Tierexperimenten über Lebensstil auf den Menschen zu übertragen. Lebensstil ist ein komplexes Konstrukt, das aus multiplen aktiven und passiven Faktoren besteht. Genetisch identische Tiere bieten jedoch die Möglichkeit einzelne Aspekte von Lebensstil kontrolliert zu simulieren und deren Einfluss auf Zellen und Kognition zu analysieren. Trotz der Einschränkungen waren die Experimente erste Schritte zum besseren Verständnis vom pro-neurogenen und -kognitiven Potenzial von Lebensstilinterventionen. Für bessere Einblicke sind jedoch komplexere Konstrukte notwendig, um „menschlichere“ Situationen zu simulieren.

4.1. Schlussfolgerung

In einer stetig alternden Gesellschaft, die zunehmend von einem passiven Lebensstil geprägt ist und in der die Prävalenz neurodegenerativer Erkrankungen steigt, wären Lebensstilinterventionen ein weltweit verfügbares und kosteneffizientes Mittel, um Morbidität und Mortalität vorzubeugen. Auch wenn es schwierig ist, Lebensstil-Experimente in Mäusen auf den Menschen zu übertragen, zeigt diese Arbeit, dass ein aktiver Lebensstil für den Aufbau einer neurogenen und kognitiven Reserve bedeutsam ist. Es ist erforderlich, physisch aktiv zu sein und mit seiner Umgebung direkt zu interagieren, um neurodegenerativen Prozessen mit abträglichen Folgen für die adulte hippocampale Neurogenese und das spatiale Gedächtnis entgegenzuwirken. Lebensstilveränderungen sind dabei zwar kein Allheilmittel, jedoch ein Weg um die Passivität unserer Gesellschaft zu überwinden und deren Folgen entgegenzuwirken, sowie eine Möglichkeit, als unterstützende Therapieform bei neurodegenerativen Erkrankungen zu wirken.

5. Referenzen

1. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965;124(3):319-335.
2. Kaplan MS, Bell DH. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci*. 1984;4(6):1429-1441.
3. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997;386(6624):493-495.
4. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci*. 1998;18(9):3206-3212.
5. Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpur M, Huttner H, Boström E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisén J. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*. 2013;153(6):1219-1227.
6. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998;4(11):1313-1317.
7. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*. 2004;27(8):447-452.
8. Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2003;467(1):1-10.
9. Leuner B, Mendolia-Loffredo S, Kozorovitskiy Y, Samburg D, Gould E, Shors TJ. Learning Enhances the Survival of New Neurons beyond the Time when the Hippocampus Is Required for Memory. *J Neurosci*. 2004;24(34):7477-7481.
10. Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*. 2003;130(2):391-399.
11. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(19):10409-10414.
12. Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 2003;460(4):563-572.
13. Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 2007;10(3):355-362.
14. Fortin NJ, Agster KL, Eichenbaum HB. Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nat Neurosci*. 2002;5(5):458.
15. Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience*. 2005;130(4):843-852.
16. Gil-Mohapel J, Brocardo PS, Choquette W, Gothard R, Simpson JM, Christie BR. Hippocampal Neurogenesis Levels Predict WATERMAZE Search Strategies in the Aging Brain. *PLoS One*. 2013;8(9):1-19.
17. Garthe A, Behr J, Kempermann G. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One*. 2009;4(5):e5464.
18. Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus*. 2006;16(3):296-304.

19. Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza P-V, Abrous DN. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(24):14385-14390.
20. Garthe A, Roeder I, Kempermann G. Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*. 2016;26(2):261-271.
21. Koehl M, Abrous DN. A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2011;33(6):1101-1114.
22. Hagg T. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci*. 2005;28(11):589-595.
23. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 1999;2(3):266-270.
24. Ramírez-Rodríguez G, Klempin F, Babu H, Benítez-King G, Kempermann G. Melatonin Modulates Cell Survival of New Neurons in the Hippocampus of Adult Mice. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34(9):2180-2191.
25. Rosenzweig MR, Bennett EL. Cerebral changes in rats exposed individually to an enriched environment. *J Comp Physiol Psychol*. 1972;80(2):304-313.
26. Iggena D, Klein C, Garthe A, Winter Y, Kempermann G, Steiner B. Only watching others making their experiences is insufficient to enhance adult neurogenesis and water maze performance in mice. *Sci Rep*. 2015;5:14141.
27. Kott J, Leach G, Yan L. Direction-Dependent Effects of Chronic “jet-Lag” on Hippocampal Neurogenesis. *Neurosc let*. 2012;515(2):177-180.
28. Gibson EM, Wang C, Tjho S, Khatrar N, Kriegsfeld LJ. Experimental “jet lag” inhibits adult neurogenesis and produces long-term cognitive deficits in female hamsters. *PLoS One*. 2010;5(12):e15267.
29. Cho K. Chronic “jet lag” produces temporal lobe atrophy and spatial cognitive deficits. *Nat Neurosci*. 2001;4(6):567-568.
30. Boitard C, Etchamendy N, Sauviant J, Aubert A, Tronel S, Marighetto A, Layé S, Ferreira G. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus*. 2012;22(11):2095-2100.
31. Park HR, Park M, Choi J, Park K-Y, Chung HY, Lee J. A High-Fat Diet Impairs Neurogenesis: Involvement of Lipid Peroxidation and Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Neurosc let*. 2010;482(3):235-239.
32. Kanoski SE, Davidson TL. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav*. 2011;103(1):59-68.
33. Noble EE, Mavanji V, Little MR, Billington CJ, Kotz CM, Wang C. Exercise reduces diet-induced cognitive decline and increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor in CA3 neurons. *Neurobiol Learn Mem*. 2014;114:40-50.
34. Molteni R, Wu A, Vaynman S, Ying Z, Barnard R, Gómez-Pinilla F. Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*. 2004;123(2):429-440.
35. Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson’s disease. *Nature*. 1988;334(6180):345-348.

36. Gasbarri A, Sulli A, Packard MG. The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1997;21(1):1-22.
37. Gasbarri A, Verney C, Innocenzi R, Campana E, Pacitti C. Mesolimbic Dopaminergic Neurons Innervating the Hippocampal Formation in the Rat: A Combined Retrograde Tracing and Immunohistochemical Study. *Brain Res*. 1994;668(1):71-79.
38. de Lau LML, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006;5(6):525-535.
39. Pillon B, Dubois B, Bonnet AM, Esteguy M, Guimaraes J, Vigouret JM, Lhermitte F, Agid Y. Cognitive slowing in Parkinson's disease fails to respond to levodopa treatment: the 15-objects test. *Neurology*. 1989;39(6):762-768.
40. Pothakos K, Kurz MJ, Lau YS. Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. *BMC Neurosci*. 2009;10:6.
41. Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci*. 2004;7(7):726-735.
42. Das NR, Gangwal RP, Damre MV, Sangamwar AT, Sharma SS. A PPAR- β/δ agonist is neuroprotective and decreases cognitive impairment in a rodent model of Parkinson's disease. *Curr Neurovasc Res*. 2014;11(2):114-124.
43. Tillerson JL, Caudle WM, Reverón ME, Miller GW. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2003;119(3):899-911.
44. Sung YH. Effects of treadmill exercise on hippocampal neurogenesis in an MPTP /probenecid-induced Parkinson's disease mouse model. *J Phys Ther Sci*. 2015;27(10):3203-3206.
45. Aguiar AS, Lopes SC, Tristão FSM, Rial D, de Oliveira G, da Cunha C, Raisman-Vozari R, Prediger RD. Exercise Improves Cognitive Impairment and Dopamine Metabolism in MPTP-Treated Mice. *Neurotox Res*. 2016;29(1):118-125.
46. Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, Mori K. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport*. 2000;11(9):1991-1996.
47. Iggena D, Winter Y, Steiner B. Melatonin restores hippocampal neural precursor cell proliferation and prevents cognitive deficits induced by jet lag simulation in adult mice. *J Pineal Res*. 2017;62(4):e12397.
48. Klein C, Jonas W, Iggena D, Empl L, Rivalan M, Wiedmer P, Spranger J, Hellweg R, Winter Y, Steiner B. Exercise prevents high-fat diet-induced impairment of flexible memory expression in the water maze and modulates adult hippocampal neurogenesis in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2016;131:26-35.
49. Klein C, Rasińska J, Empl L, Sparenberg M, Poshtiban A, Hain EG, Iggena D, Rivalan M, Winter Y, Steiner B. Physical exercise counteracts MPTP-induced changes in neural precursor cell proliferation in the hippocampus and restores spatial learning but not memory performance in the water maze. *Behav Brain Res*. 2016;307:227-238.
50. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-275.

51. Hellweg R, Baethge C, Hartung HD, Brückner MK, Arendt T. NGF level in the rat sciatic nerve is decreased after long-term consumption of ethanol. *Neuroreport*. 1996;7(3):777-780.
52. Hellweg R, von Arnim CAF, Büchner M, Huber R, Riepe MW. Neuroprotection and neuronal dysfunction upon repetitive inhibition of oxidative phosphorylation. *Exp Neurol*. 2003;183(2):346-354.
53. Karl T, Pabst R, von Hörsten S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxicol Pathol*. 2003;55(1):69-83.
54. Ferchmin PA, Bennett EL. Direct contact with enriched environment is required to alter cerebral weights in rats. *J Comp Physiol Psychol*. 1975;88(1):360-367.
55. Held R, Hein A. Movement-produced stimulation in the development of visually guided behavior. *J Comp Physiol Psychol*. 1963;56:872-876.
56. Kim Y, Wilkens LR, Park SY, Goodman MT, Monroe KR, Kolonel LN. Association between various sedentary behaviours and all-cause, cardiovascular disease and cancer mortality: the Multiethnic Cohort Study. *Int J Epidemiol*. 2013;42(4):1040-1056.
57. Wilmot EG, Edwardson CL, Achana FA, Davies MJ, Gorely T, Gray LJ, Khunti K, Yates T, Biddle SJH. Sedentary time in adults and the association with diabetes, cardiovascular disease and death: systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*. 2012;55(11):2895-2905.
58. Sund AM, Larsson B, Wichstrøm L. Role of physical and sedentary activities in the development of depressive symptoms in early adolescence. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*. 2011;46(5):431-441.
59. Kempermann G. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends Neurosci*. 2008;31(4):163-169.
60. Ramirez-Rodriguez G, Ortíz-López L, Domínguez-Alonso A, Benítez-King GA, Kempermann G. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J Pineal Res*. 2011;50(1):29-37.
61. Mitler MM, Carskadon MA, Czeisler CA, Dement WC, Dinges DF, Graeber RC. Catastrophes, sleep, and public policy: consensus report. *Sleep*. 1988;11(1):100-109.
62. Iwamoto A, Kawai M, Furuse M, Yasuo S. Effects of chronic jet lag on the central and peripheral circadian clocks in CBA/N mice. *Chronobiol Int*. 2014;31(2):189-198.
63. Monk TH. Aging human circadian rhythms: conventional wisdom may not always be right. *J Biol Rhythms*. 2005;20(4):366-374.
64. Luchsinger JA, Noble JM, Scarmeas N. Diet and Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2007;7(5):366-372.
65. Klein C, Hain EG, Braun J, Riek K, Mueller S, Steiner B, Sack I. Enhanced adult neurogenesis increases brain stiffness: in vivo magnetic resonance elastography in a mouse model of dopamine depletion. *PLoS One*. 2014;9(3):e92582.
66. Lesemann A, Reinel C, Hühnchen P, Pilhatsch M, Hellweg R, Klaisle P, Winter C, Steiner B. MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. *Brain Res*. 2012;1457:51-69.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Deetje Iggena, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Einfluss von aktivem Lebensstil und physischer Aktivität auf die adulte hippocampale Neurogenese und spatiale Kognition unter physiologischen und pathologischen Bedingungen im Mausmodell.*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Berlin, 26.09.2017

Deetje Iggena

Anteilerklärung an den ausgewählten Publikationen

Deetje Iggena hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Deetje Iggena, Charlotte Klein, Alexander Garthe, York Winter, Gerd Kempermann, Barbara Steiner. Only watching others making their experiences is insufficient to enhance adult neurogenesis and water maze performance in mice. *Scientific Reports*. 2015;5: 14141. doi: 10.1038/srep14141.

Beitrag im Einzelnen: Anpassung und Weiterentwicklung des Studiendesigns, Planung und Durchführung der Tier- und Verhaltensexperimente, Gewebepreparation, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz, Erhebung und Auswertung der Daten, statistische Auswertung und grafische Aufarbeitung der Daten in SPSS und Matlab, Schreiben und Revision des Manuskripts.

Publikation 2:

Deetje Iggena, York Winter, Barbara Steiner. Melatonin restores hippocampal neural precursor cell proliferation and prevents cognitive deficits induced by jet lag simulation in adult mice. *Journal of Pineal Research*. 2017; 62(4) pp: e12397.

Beitrag im Einzelnen: Initiierung der Studie, Studienplanung und Studiendesign, Planung und Durchführung der Tier- und Verhaltensexperimente, Gewebepreparation, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz, Erhebung und Auswertung der Daten, statistische Auswertung und grafische Aufarbeitung der Daten in SPSS und Matlab, Schreiben und Revision des Manuskripts.

Publikation 3:

Charlotte Klein, Wenke Jonas, Deetje Iggena, Laura Empl, Marion Rivalan, Petra Wiedmer, Joachim Spranger, Rainer Hellweg, York Winter, Barbara Steiner. Exercise prevents high-fat diet-induced impairment of flexible memory expression in the water maze and modulates adult hippocampal neurogenesis in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2016;131: 26 – 35.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Tier- und Verhaltensexperimente, Erhebung und Auswertung von Daten der Verhaltenstests, Revision des Manuskripts.

Publikation 4:

Charlotte Klein, Justyna U Rasinska, Laura Empl, Maria Sparenberg, Poshtiban Anahita, Elisabeth G Hain, Deetje Iggena, Marion Rivalan, York Winter, Barbara Steiner: Physical exercise counteracts MPTP-induced changes in neural precursor cell proliferation in the hippocampus and restores spatial learning but not memory performance in the water maze. Behavioral Brain Research. 2016;307: 227 – 238.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Tier- und Verhaltensexperimente, Erhebung und Auswertung von Daten der Verhaltenstests, Revision des Manuskripts.


Unterschrift, Datum und Stempel

PD Dr. med. Barbara Steiner

Unterschrift

Deetje Iggena

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Only watching others making their experiences is insufficient to enhance adult neurogenesis and water maze performance in mice

Received: 20 February 2015
Accepted: 05 August 2015
Published: 15 September 2015

Deetje Iggena¹, Charlotte Klein¹, Alexander Garthe^{2,3}, York Winter⁴, Gerd Kempermann^{2,3} & Barbara Steiner¹

In the context of television consumption and its opportunity costs the question arises how far experiencing mere representations of the outer world would have the same neural and cognitive consequences than actively interacting with that environment. Here we demonstrate that physical interaction and direct exposition are essential for the beneficial effects of environmental enrichment. In our experiment, the mice living in a simple standard cage placed in the centre of a large enriched environment only indirectly experiencing the stimulus-rich surroundings (IND) did not display increased adult hippocampal neurogenesis. In contrast, the mice living in and directly experiencing the surrounding enriched environment (DIR) and mice living in a similar enriched cage containing an uninhabited inner cage (ENR) showed enhanced neurogenesis compared to mice in control conditions (CTR). Similarly, the beneficial effects of environmental enrichment on learning performance in the Morris Water maze depended on the direct interaction of the individual with the enrichment. In contrast, indirectly experiencing a stimulus-rich environment failed to improve memory functions indicating that direct interaction and activity within the stimulus-rich environment are necessary to induce structural and functional changes in the hippocampus.

The exposure to environmental enrichment is beneficial for structural and functional changes in the brain. Living in an enriched environment enhances the survival of newborn neurons in the hippocampus of adult mice, whereas physical activity predominantly stimulates the proliferation of hippocampal precursor cells^{1,2}. Both external stimuli are additive and thus lead to a remarkable net increase in adult neurogenesis³. In several studies, this increased amount of newborn neurons has been linked to the improvement of certain hippocampal-dependent functions including spatial learning^{1,3–6}. These observations relate to the medical observation that physical and cognitive activity reduce the risk of memory decline and neurodegenerative disorders^{7,8}.

As “activity” promotes neurogenesis, motility in a stimulus-rich world might be a strong modulator of neurogenesis-related function. Indeed, in a longitudinal study individual levels of active exploration and territorial coverage (“roaming entropy”) correlated with adult hippocampal neurogenesis⁹. However, an enriched environment is more than merely an incentive for increased levels of motility. Instead it represents a complex inanimate and social stimulation consisting of multiple factors in numerous domains¹⁰.

¹Department of Neurology, Charité Universitätsmedizin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin. ²German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) Dresden, Arnoldstraße 18, 01307 Dresden. ³CRTD – Center for Regenerative Therapies Dresden, Technische Universität Dresden, Fetscherstraße 105, 01307 Dresden. ⁴Institute of Biology and Berlin Mouse Clinic for Neurology and Psychiatry, Humboldt-Universität Berlin, Dorotheenstraße 96, 10117 Berlin. Correspondence and requests for materials should be addressed to G.K. (email: gerd.kempermann@dzne.de) or B.S. (email: barbara.steiner@charite.de)

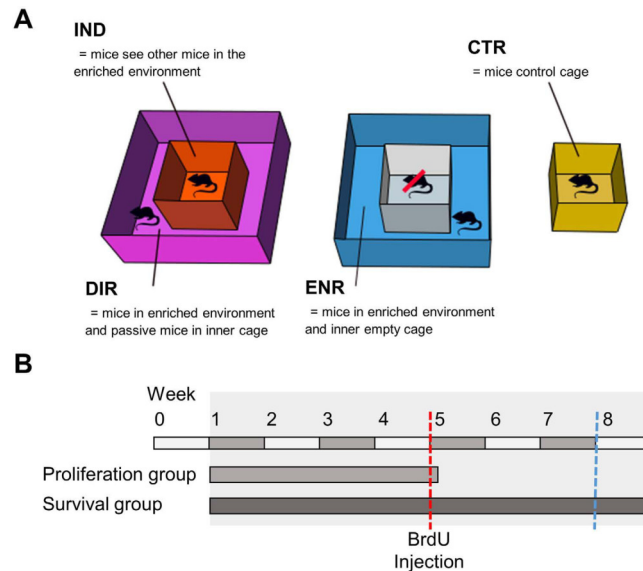


Figure 1. Experimental set-up. (A) Housing conditions. Mice lived in and directly experienced an enriched environment (DIR) while the mice in the inner standard cage indirectly experienced the surrounding enriched environment and its inhabitants (IND). Mice lived in an enriched environment which contained an uninhabited inner cage (ENR). Mice lived in a standard cage without any confrontation to environmental enrichment (CTR). The measures of the ENR/DIR cage: $0.74\text{ m} \times 0.3\text{ m} \times 0.74\text{ m}$ (W/H/D), the measures of the CTR/IND cage: $0.27\text{ m} \times 0.15\text{ m} \times 0.42\text{ m}$ (W/H/D). (B) Experimental timeline. Mice received three BrdU-injections on day 28 of the experiment. To assess cell proliferation mice were killed 24h after injection, to investigate cell survival mice were killed four weeks after injection. Spatial memory was assessed during the eighth week of the experiment.

Due to the complexity of an enriched environment the extent to which individual identifiable factors, including cognitive stimuli, contribute to the positive overall outcome has remained largely unknown.

Usually, mice living in an enriched environment are able to directly interact with their stimulating surrounding^{1,3,6,10}. However, considering that a sedentary lifestyle is increasingly common we were in particular interested in the effects of indirect exposure and passive confrontation with such an environment¹¹. We asked whether active participation is required for the beneficial effects of environmental enrichment on the brain or whether the merely indirect exposure to sights, sounds and odors of other mice directly experiencing that environment would be sufficient to enhance adult hippocampal neurogenesis. To answer this question we randomly assigned our mice to four different housing conditions (Fig. 1A) and exposed them either directly or indirectly to environmental enrichment for four or eight weeks (Fig. 1B). We conducted histological studies to investigate adult hippocampal neurogenesis and tested the mice in the Morris water maze to assess spatial memory as example of potential functional consequences.

Results

Direct interaction with environmental enrichment increases the survival of newborn neurons.

Adult neurogenesis was assessed by the standard methodology based on bromodeoxyuridine (BrdU)-incorporation into the dividing precursor cells and immunohistochemical analysis of their progeny¹². Typically for the enrichment paradigm, direct exposure to the environmental enrichment elicited a strong pro-survival effect on newborn cells four weeks after BrdU-incorporation (Fig. 2A,B; $F_{3,25} = 13.809$, $P < 0.001$; post-hoc: ENR versus CTR, $P < 0.001$; DIR versus CTR, $P = 0.001$). However, this beneficial effect on neurogenesis was absent in the IND group with prohibited direct interaction and only indirect exposure to an enriched environment (IND versus CTR, $P = 0.227$). We further explored whether the observed difference was due to an increased number of newborn neurons by estimating BrdU⁺/NeuN⁺ colabeling. ENR and DIR showed significantly more NeuN-positive neurons than CTR (Fig. 2C; $F_{3,25} = 11.673$, $P < 0.0001$; post-hoc: ENR versus CTR, $P < 0.001$; DIR versus CTR; $P = 0.003$) while the indirect exposure did not affect neuronal differentiation (IND versus CTR, $P = 0.401$) suggesting that indirect exposure is an inadequate stimulus for adult neurogenesis. Instead, direct interaction is required to enhance the survival of newborn neurons.

Hippocampal cell proliferation remains unaffected by environmental enrichment. We next examined hippocampal proliferation in transgenic Nestin-GFP mice using BrdU-immunohistochemistry and determined the different subpopulations of neuronal precursor cells by colabeling for neuronal

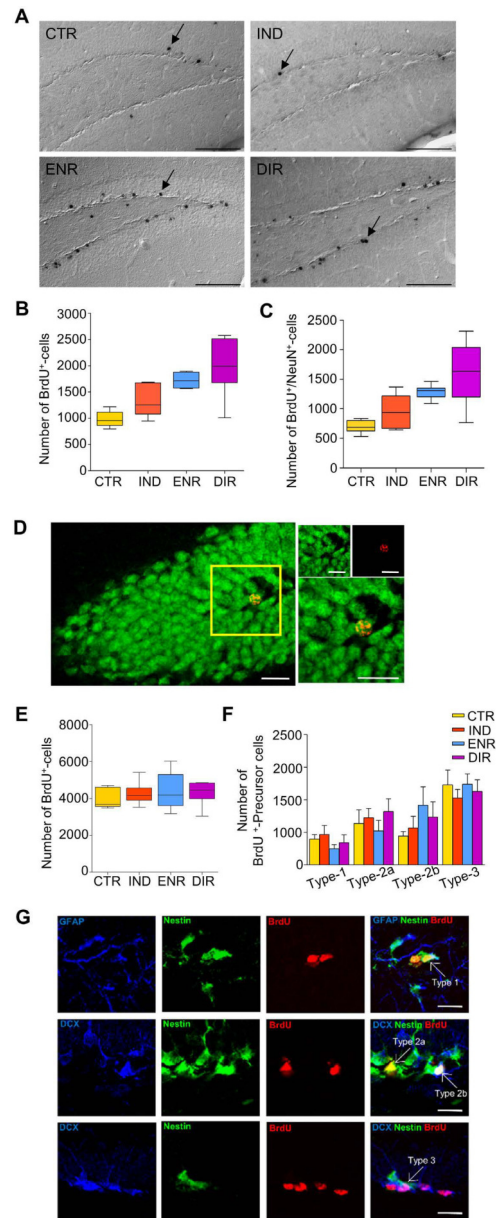


Figure 2. Newborn cells in the granule cell layer of the dentate gyrus. (A) Representative DIC-images of BrdU-immunohistochemistry in CTR, IND, ENR and DIR showing four weeks old cells. Arrows highlight exemplary BrdU⁺-cells. Scale bar, 100 μm. (B) Absolute number of survived BrdU⁺-cells four weeks after BrdU-incorporation. ENR and DIR displayed significantly more cells (ENR versus CTR, $P < 0.001$; DIR versus CTR, $P = 0.001$) while IND and CTR did not differ (IND versus CTR, $P = 0.227$). (C) Absolute number of survived neurons labeled by BrdU and the neuronal marker NeuN. ENR and DIR (ENR versus DIR, $P = 0.481$) did not differ, but showed increased neurogenesis compared to CTR (ENR versus CTR, $P < 0.001$; DIR versus CTR, $P = 0.003$) while IND did not differ from CTR and ENR (IND versus CTR, $P = 0.401$; IND versus ENR, $P = 0.219$), but from DIR (IND versus DIR, $P = 0.048$). CTR, $N = 7$; IND, $N = 6$; ENR, $N = 7$; DIR, $N = 9$. (D) Representative confocal images of NeuN⁺ (green)/BrdU⁺ (red) cells appearing orange when colabeled. Scale bars 20 μm. (E) Absolute number of BrdU⁺-cells 24 hours after BrdU-incorporation. Environmental enrichment did not affect cell proliferation rate ($P = 0.761$). CTR, $N = 5$; IND, $N = 6$; ENR, $N = 5$; DIR, $N = 10$. (F) Absolute number of BrdU⁺-cells in the subpopulations of hippocampal proliferating neurons 24 hours after BrdU-incorporation. Environmental enrichment did not affect any neuronal subpopulation of precursor cells. (G) Representative confocal images of BrdU-labeled type 1 (GFAP⁺/Nestin⁺), type 2a (Nestin⁺), type 2b (Nestin⁺/Dcx⁺) and type 3 (Dcx⁺) neuronal precursor cells. Scale bars 20 μm. Data presented as boxplots with a centre line as median, Tukey-style whiskers extend 1.5 times the interquartile range from 25th and 75th percentiles and dots represent outliers. Numbers of precursor cells shown as mean ± s.e.m.

markers^{13,14}. As predicted, neither direct nor indirect exposure to an enriched environment increased hippocampal cell proliferation 24 hours after BrdU-incorporation (Fig. 2E; $F_{3,22} = 0.391$; $P = 0.761$). Similarly, our additional investigations revealed no differences in the subtypes of neuronal precursor cells (Fig. 2F). The groups neither differed in the number of type 1, Nestin⁺/GFAP⁺-cells, ($F_{3,17} = 0.730$, $P = 0.548$) type 2a, Nestin⁺-cells, ($F_{3,21} = 0.467$, $P = 0.709$) type 2b, Nestin⁺/Dcx⁺-cells ($F_{3,21} = 0.704$, $P = 0.560$) nor type 3, Dcx⁺-cells, ($F_{3,21} = 0.271$, $P = 0.846$) cells. The histological analysis indicates that the beneficial effects of direct interaction with an enriched environment are in particular due to survival-promoting effects instead of increasing the cell proliferation rate or influencing the distribution of the different subpopulations of neuronal precursor cells.

Direct interaction with environmental enrichment improves Morris water maze performance. We next related our morphological results to behavioral data. Our mice were tested in a modified reversal learning version of the Morris water maze task that is able to detect alterations in cognitive performance associated with adult neurogenesis¹⁵. All groups started from the same base line showing no differences regarding the length of swim path during the first trial of day 1 ($F_{3,37} = 0.603$, $P = 0.617$) and performed similar over the entire first day. As indicated by the number of crossings at the previous goal location during the first trial after moving the platform to another quadrant all groups learned the task well (Fig. 3A; $F_{3,37} = 0.216$, $P = 0.885$). Additionally, no differences were found for swim path lengths during the first trial following goal reversal (day 4, $F_{3,37} = 0.599$, $P = 0.620$).

Environmental enrichment had the anticipated beneficial effect on task performance compared to CTR. Post-hoc analysis over all trials revealed that the average swim path to the hidden platform was significantly shorter in ENR (Fig. 3B; Repeated measures ANOVA: $F_{3,241} = 10.343$, $P < 0.001$; post-hoc: ENR versus CTR, $P = 0.030$). This effect appeared to be particular strong at the end of the acquisition phase (day 3, $F_{3,242} = 6.920$, $P < 0.001$; post-hoc: ENR versus CTR, $P = 0.031$). Interestingly, although DIR experienced the same length of exposure to environmental enrichment as mice from the ENR group, the swim path to target shown by DIR mice did not differ from CTR (over all days: DIR versus CTR, $P = 0.999$) nor on any single day (Day 1: $P = 0.135$; day 2: $P = 0.154$; day 3: $P = 0.961$; day 4: $P = 0.971$; day 5: $P = 1.000$). On the second day, DIR even appeared to perform worse than ENR ($F_{3,242} = 6.248$, $P < 0.001$ post-hoc: ENR versus DIR, $P = 0.050$).

Even more surprising was the observation that IND performed worse than CTR in the water maze. Over all trials, IND showed significantly longer swim paths to target (IND versus CTR, $P = 0.036$). This discrepancy became particularly apparent on day 2 (IND versus CTR, $P = 0.012$), while on day 4 at least a trend to difference was observable ($F_{3,242} = 5.078$, $P = 0.002$; IND versus CTR, $P = 0.076$). These results suggest that the merely indirect exposure to environmental enrichment is insufficient to improve spatial memory and might even induce certain adverse effects on memory formation.

In addition to this overall analysis of water maze performance, we assessed the effect of different types of enrichment on distinct learning phases. We analyzed the swim path to target separately during acquisition (days 1 to 3) and reversal (days 4 and 5). Remarkably, the inferiority of IND compared to CTR was predominantly present during the reversal phase. While the analysis revealed a difference between IND and CTR on days 4 and 5 (Repeated measures ANOVA: $F_{3,242} = 7.549$, $P < 0.0001$; post-hoc: IND versus CTR, $P = 0.032$), no difference between IND and CTR during acquisition could be detected (Repeated measures ANOVA: $F_{3,241} = 6.397$, $P < 0.001$; post-hoc: IND versus CTR, $P = 0.379$). These results indicate that in IND memory is especially affected in terms of flexibility and the ability to relearn. A similar pattern was revealed comparing DIR to ENR: during acquisition DIR and ENR performed similarly ($P = 0.730$), but reversal analysis revealed a trend to worse performance in DIR mice, which however remained statistically insignificant ($P = 0.087$). Neither during acquisition nor during reversal DIR differed from CTR ($P = 0.881$ and $P = 0.987$, respectively). The “normal” enrichment group ENR displayed a trend to differ from CTR during acquisition ($P = 0.084$), while there was no evidence of a difference between ENR and CTR during reversal ($P = 0.349$). It seems that while ENR possibly outperformed CTR during acquisition, IND and DIR were unable to do likewise and even performed worse during reversal compared to CTR and ENR, respectively. Flexibility seems to be the main aspect of memory formation to be affected by the experimental design of indirect versus direct exposure to environmental enrichment, thereby contributing to the reduced overall performance of IND and DIR in the Morris water maze (Fig. 4).

Direct interaction with environmental enrichment enhances the quality of spatial learning. We next analyzed qualitative aspects of the spatial learning. First, we plotted the presence probability of the mice in the circular water maze arena. On day 4, the heatmap visualizes the faster reversal learning in ENR. ENR evolved a clear local preference for the new target already during the third trial, whereas the other groups struggled to develop a new preference. Even in DIR a new strong local preference for the new platform location did not evolve as quickly as in ENR. This fits the observation that DIR required a longer swim path to the target than ENR. However, group differences regarding the average distance to target could not be revealed, but between IND and ENR during the third trial on day 4 ($F_{3,37} = 4.786$, $P = 0.006$, IND versus ENR, $P = 0.004$). Second, we investigated the efficiency of the chosen search strategies and whether these strategies were hippocampus-dependent. To classify the search strategies the sequence of xy-coordinates was analysed using an algorithm introduced previously¹⁵. The

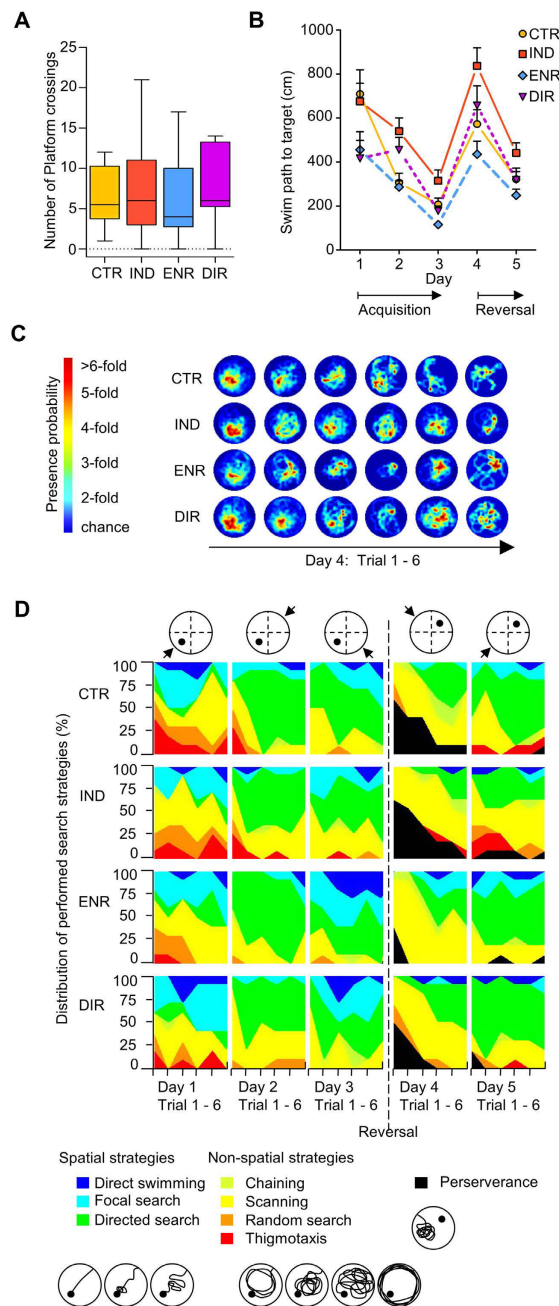


Figure 3. Performance in a reversal-learning type of the Morris water maze. (A) All groups learned to navigate to the platform during the acquisition phase (days 1 to 3) thus the groups did not differ in the total number of crossing of the previous target zone during the first trial on day four after the platform was relocated. ($P = 0.885$). (B) The ability to reach the platform as fast as possible differed between the groups. ENR displayed a significantly shorter swim path than CTR while DIR only differed from IND but not from CTR. IND needed even a significantly longer swim path than CTR. (IND versus ENR, $P < 0.001$; IND versus DIR, $P = 0.016$; CTR versus ENR, $P = 0.030$; CTR versus IND, $P = 0.036$; ENR versus DIR, $P = 0.141$; CTR versus DIR, $P = 0.999$) (C) Heatmaps depict the development of spatial preferences in the water tank after the platform had been relocated into the opposite quadrant on day four. Although no statistical difference regarding distance to target could be revealed but between IND and ENR in trial 3 ($F_{3,37} = 4.786$, $P = 0.006$, IND versus ENR, $P = 0.004$), the heatmaps visualize ENR's faster reversal learning and development of a local preference for the new target already during the third trial while the other groups struggled to develop a new preference. (D) Distribution of performed search-strategies during the five days. IND used more inefficient non-spatial strategies to reach the goal than expected (Chi-square = 34.276, $P < 0.001$; IND 58.4%, CTR 43.9%, DIR 42.1%, ENR 35.4%). Number of platform crossings presented as boxplots with a centre line as median, Tukey-style whiskers extend 1.5 times the interquartile range from 25th and 75th percentiles. Swim path to target presented as mean \pm s.e.m. CTR, $N = 10$; IND, $N = 11$; ENR, $N = 10$; DIR, $N = 10$.

	CTR	IND	ENR	DIR
Survival of newborn cells (BrdU ⁺ -cells)	986.57 ± 54.49	1323.50 ± 123.78 (P = 0.227) →	1710.00 ± 52.31 (P < 0.001) ↑	2014.00 ± 170.98 (P = 0.001) ↑
Survival of newborn neurons (BrdU ⁺ /NeuN ⁺ -cells)	689.36 ± 39.57	955.67 ± 121.60 (P = 0.401) →	1288.19 ± 44.37 (P < 0.001) ↑	1602.26 ± 167.89 (P = 0.003) ↑
Proliferation of newborn precursor cells (BrdU ⁺ -cells)	4010.40 ± 250.77	4259.00 ± 256.15 →	4400.40 ± 464.69 →	4479.00 ± 283.20 →
Number of type 1 cells (GFAP ⁺ /Nestin ⁺ -cells)	395.78 ± 68.80	466.44 ± 137.80 →	248.33 ± 63.74 →	339.62 ± 120.66 →
Type 2a cells (Nestin ⁺ -cells)	635.85 ± 209.09	723.20 ± 140.24 →	521.13 ± 163.32 →	819.49 ± 193.12 →
Type 2b cells (Nestin ⁺ /Dcx ⁺ -cells)	440.28 ± 71.26	566.98 ± 180.55 →	916.82 ± 282.88 →	734.08 ± 234.75 →
Type 3 cells (Dcx ⁺ -cells)	1229.62 ± 223.73	1024.46 ± 135.07 →	1238.46 ± 156.95 →	1126.60 ± 180.46 →
Length of swim path (day 1 – 5)	423.56 ± 42.56cm	547.60 ± 29.44cm (P = 0.036) ↑	308.48 ± 22.96cm (P = 0.030) ↓	405.36 ± 30.48cm P = 0.999 →
Length of swim path (day 1)	709.23 ± 98.55cm	675.53 ± 82.65cm (P = 1.000) →	455.82 ± 81.46cm (P = 0.264) →	416.58 ± 81.45cm (P = 0.135) →
Length of swim path (day 2)	306.22 ± 42.67cm	540.29 ± 60.18cm (P = 0.012) ↑	286.64 ± 28.53cm (P = 0.999) →	455.88 ± 55.98cm (P = 0.154) →
Length of swim path (day 3)	207.29 ± 29.0 cm	315.03 ± 48.29cm (P = 0.303) →	116.0 ± 13.07cm (P = 0.031) ↓	177.49 ± 22.52cm (P = 0.961) →
Length of swim path (day 4)	572.60 ± 65.59cm	837.29 ± 82.02cm (P = 0.076) →	435.40 ± 59.95cm (P = 0.552) →	657.29 ± 89.22cm (P = 0.971) →
Length of swim path (day 5)	322.45 ± 49.75cm	440.82 ± 46.89cm (P = 0.417) →	248.53 ± 28.39cm (P = 0.738) →	319.58 ± 37.37cm (P = 1.000) →
Length of swim path (acquisition, day 1 – 3)	407.58 ± 40.28cm	502.02 ± 38.10cm (P = 0.379) →	286.15 ± 30.74cm (P = 0.349) →	349.98 ± 34.83cm (P = 0.881) →
Length of swim path (reversal, day 4 – 5)	447.52 ± 26.92cm	615.60 ± 48.19cm (P = 0.032) ↑	341.96 ± 34.12cm (P = 0.084) →	488.43 ± 50.59cm (P = 0.987) →
Non-spatial search strategies (day 1 – 5)	43.9% ^a	53.8% ^b (P < 0.001) ↑	42.1% ^a →	35.4% ^a →
Choice of perseverance as strategy (day 4)	28.3% ^a	31.3% ^a →	6.7% ^b (P = 0.002) ↓	15.3% ^{ab} →

Figure 4. Table of results. Showing an overview of the experimental results regarding histology, length of swim path and choice of search strategies during the Morris water maze. The groups IND, ENR and DIR are compared to CTR. Data is presented as mean value ± s.e.m. In case of significant main effects, the p-value of the followed post-hoc analysis is presented.

statistical analysis of independence revealed that IND mice more often used hippocampus independent non-spatial like thigmotaxis, random search, scanning and chaining and thus chose less efficient strategies to navigate to the platform than compared to control and the other groups would have been expected (Fig. 3D; chi-square (3) = 34.276, $P < 0.001$, IND (53.8%) versus CTR (43.9%), DIR (42.1%), ENR (35.4%)). This result adds qualitative details to the observed prolonged latency and swim paths to the platform and indicates that functional plasticity is reduced in IND compared to CTR. With respect to “perseverance”, characterized by an incorrect, prolonged preference for the previous goal on day 4, ENR persevered less than CTR and IND (chi-square (21) = 44.782, $P = 0.002$, IND (31.3%), CTR (28.3%), DIR (15.3%), ENR (6.7%). This is matching the impression that can be gained from the heatmaps. The general preference of other strategies than perseverance probably contributes to the overall superior performance of ENR (Fig. 4).

Discussion

Our data indicate that the beneficial effects of environmental enrichment depend on the direct interaction of the individual with that environment. In contrast, merely watching (as well as hearing and smelling) other mice directly experiencing that stimulus-rich environment was insufficient to enhance adult hippocampal neurogenesis and failed to improve memory functions. The prevented direct interaction of the mice with environmental enrichment and other mice close-by even seems to have certain adverse effects on spatial learning.

Generally, our study confirms that environmental enrichment is a strong extrinsic neurogenic stimulus. But we also found the three groups experiencing enrichment in the present experiment (DIR,

IND and ENR) to be benefitting differently from the external stimulation. It appeared, for example, that the beneficial effects of an enriched environment on spatial memory were less pronounced in the DIR group than in the classical ENR group. These data were surprising at first. Potential confounders have to be discussed, which would result in a reduced enhancement of spatial memory by environmental enrichment that otherwise is known to be a robust stimulus of learning and memory performance and adult neurogenesis. However, both DIR and ENR groups had indeed the exact same floor size and cage design with the same possibility for physical activity and inter-individual stimulation, but ENR lacked mice in the inner cage. Possibly, the mice living in the inner cage acted as a distracting factor for DIR and thus reduced the positive impact of environmental enrichment on water maze performance. This might likewise apply to IND, which showed the poorest performance in the Morris water maze task. Also here the cage size and design were exactly the same as in CTR. The surroundings of the cages and the experimenters and animal care takers did not change over the experiment period to avoid the potential influence of an additional stimulation or stress. It might be that the proximity of other mice, which are only separated from the own group by a transparent wall, influenced hippocampus-dependent cognitive functions. Potentially, this effect was provoked by the inability of the two groups to directly interact with each other. This observation raises interesting questions about the role of social interactions in the effects elicited by environmental enrichment¹⁶.

A study from the 1970s is in line with our findings, reporting that rats observing other rats in environmental enrichment neither displayed increased brain weight nor improved exploratory behavior¹⁷. Similarly, passive motion in a visually stimulating environment did not enhance performance in visual-spatial discrimination tasks¹⁸. Neither adult hippocampal neurogenesis nor spatial memory have been investigated in these paradigms.

Another study has confronted mice with a locked running-wheel, which, surprisingly, resulted in an increase in cell proliferation in the hippocampus¹⁹. Even though in that study the running-wheel could not be used for running, the mice could still directly interact with the running-wheel which thus by itself might be sufficient to contribute to enrichment, resulting in the observed effect on adult neurogenesis. We did not see a similar effect on hippocampal cell proliferation in any of our groups though, which is consistent with the prevailing notion that enriched environments primarily affect cell survival rather than precursor cell proliferation.

That previous evidence is also relevant with respect to the obvious notion that the levels of physical activity will have differed between our groups. Given that as yet no monitoring system is available that would allow measuring the low levels of motility in our cage-in-cage set up we do not know to what exact degree our groups differed in this respect. However, in none of the groups in the larger enriched cages did we observe increased precursor cell proliferation as it is normally displayed by mice with access to a running wheel². In fact, it was the expected survival-promoting effect on newborn neurons that resulted in increased levels of adult neurogenesis in ENR and DIR.

Physical inactivity and the mere indirect exposure to external stimulation are characteristic of a sedentary lifestyle as it is found in modern humans. Such sedentary lifestyle is characterized by sitting in conjunction with excessive television consumption and computer use and is associated with increased morbidity and mortality^{20–23}. Even though a direct transfer of our results to a human lifestyle is not advisable, cautious extrapolation to the human condition can be instructive since inactivity strongly interferes with mental and physical health^{20–23}.

While the “couch-potato analogy” is tempting and suggestive, a cautionary note is nevertheless required: we have been studying a highly reductionistic situation in mice. Lifestyle is a far more complex event consisting of multiple contributing factors. However, investigations in inbred mice with constant genetic factors enable scientists to assess the exclusive impact of emblematic environmental constellations in laboratory animals thus providing the opportunity to deepen our understanding of extrinsic neurogenic stimulation.

At present, few good experimental models are available to elucidate the complexity of lifestyle compounds and lifestyle interventions²⁴. Some researchers consider housing in a standard cage as model for inactivity, while other researchers have introduced an audio-visual overstimulation paradigm for infant mice resembling a television-like set-up and revealed ensuing deficits in cognitive performance^{25,26}.

Despite all limitations and potential confounders, our findings are first experimental steps in addressing the biological basis of the more extensive multifactorial situation in humans. In the future, advanced lifestyle experiments are needed to assess the consequences of unhealthy lifestyles. In any case, our results do support the clear indications that physical activity and direct interaction with the environment is superior to second-hand experience.

Materials and Methods

Animals. A total number of 97 female mice at the age of six to seven weeks were assigned to our experiment. 71 C57Bl/6N mice were purchased from Charles River for the assessment of cell survival and spatial memory while 26 transgenic Nestin-GFP mice, expressing green fluorescent protein under the promoter of nestin on a C57Bl/6N background, were obtained from FEM Beyer to enable the qualification of proliferating neuronal precursor cells¹⁵. All experimental procedures were conducted according to federal laws, and approved by the appropriate local authorities (LAGESO Berlin, Germany).

Experimental set-up. The mice were randomly assigned to four different groups with a minimum of $n=5$. After an adaption period, mice were placed into their assigned housing condition (Fig. 1A). The first group (IND) was housed in a simple standard cage ($0.27\text{ m} \times 0.15\text{ m} \times 0.42\text{ m}$) placed in the centre of a large enriched environment cage ($0.74\text{ m} \times 0.3\text{ m} \times 0.74\text{ m}$) and thus enabled to indirectly experience the stimulus-rich surrounding. The second group (DIR) was housed in the former mentioned enriched environment, enabled to directly experience and to physically interact with this stimulus-rich surrounding. IND and DIR were permanently confronted with each other and only separated by an acrylic Perspex wall and grids. The third group (ENR) was housed in an enriched environment cage ($0.74\text{ m} \times 0.3\text{ m} \times 0.74\text{ m}$) similar to the one of the DIR group, but containing an uninhabited inner standard cage. The fourth group (CTR) was housed in a standard cage ($0.27\text{ m} \times 0.15\text{ m} \times 0.42\text{ m}$) without any confrontation to environmental enrichment or any other mice and held under control conditions. Environmental enrichment was rearranged two to three times a week and consisted of a rearrangeable set of plastic tubes, cardboard tubes, grids, colourful cartons, varying shelters, and changing food and drinking places. All mice received food and water ad libitum and remained in a constant light/dark cycle of 12 hours. The standard cage housed 5 to 7 mice at the same time, while the ENR/DIR cage housed 5 to 10 mice at the same time. A total of 22 mice were used as CTR, four standard cages were used for this condition. A total of 23 mice were used as IND, four standard cages were used for this condition. A total of 22 mice were used as ENR, three ENR cages were used for this condition. A total of 29 mice were used as DIR, four DIR cages were used for this condition. A total of 26 transgenic GFP-nestin mice (CTR: $N=5$, IND: $N=6$, ENR: $N=5$, DIR: $N=10$) spent four weeks in the experiment and were used to analyse the proliferation of dividing precursor cells in the hippocampus. A total of 29 C57Bl/6 mice (CTR: $N=7$, IND: $N=6$, ENR: $N=7$, DIR: $N=9$) spent eight weeks in the experiment to assess the survival of newborn cells. A total of 41 C57Bl/6 mice were tested in the Morris water maze (CTR: $N=10$, IND: $N=11$, ENR: $N=10$, DIR: $N=10$) and visuo-spatial memory was assessed (Fig. 1B). The equipment of the room, experimentators and animal facility care personel remained stable over the whole experimental period.

BrdU-injection protocol. To determine the proliferation and survival of newborn cells, mice were injected with 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma) dissolved in 0.9% saline. BrdU is a thymidine analogon which incorporates into the DNA of dividing precursor cells and thus enables to assess proliferating cells. The mice received three BrdU-injections (50mg/kg) intraperitoneally within twelve hours on day 28 of the experiment. The Nestin-GFP mice were transcardially perfused 24 hours after the injection in order to determine the proliferation rate of cells while the other mice were perfused four weeks after BrdU-injection to assess the survival of the newborn cells (Fig. 1B).

Histological tissue preparation. All mice were deeply anaesthetized by an overdose of Ketamine and killed by transcardially perfusion with cold 0.1M phosphate-buffer saline (PBS, pH 7.4) followed by 4% paraformaldehyde. The mice were decapitated, the brains dissected, and stored for 24 hours in 4% paraformaldehyde for postfixation. After postfixation, the brains were dehydrated in 30% sucrose until they sunk to the bottom. Subsequently, the brains were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C till further processing. For histological analysis, the brains were cut into $40\mu\text{m}$ thick coronal sections using a cryostat (Leica DM 1850) and stored in cryoprotectant at 4°C till staining.

Immunohistochemistry and analysis. To quantify the number of newborn cells, one-in-a-6 series ($240\mu\text{m}$ apart) of the sections were stained for BrdU-detection as described previously¹². Sections were pretreated with 0.6% H_2O_2 for 30 minutes to block endogenous tissue peroxidase. After washing the free-floating sections in PBS, DNA was denaturated with 2N HCL for 30 minutes at 37°C . The sections were then rinsed in borate buffer for 10 minutes followed by washing with PBS. To prevent unspecific antibody binding, sections were treated with PBS+ (0.1% TritonX-100, 3% donkey serum) for 30 minutes before being incubated overnight with the primary antibody against BrdU (rat, Biozol) diluted 1:500 in PBS+. The primary antibody was washed out with PBS the next day. Subsequently, the sections were blocked again with PBS+ for 25 minutes followed by incubation with the biotinylated secondary antibody (anti-rat, Dianova) diluted 1:250 in PBS+ for two hours at room temperature. After washing out the secondary antibody, avidin biotin peroxidase complex reagent (ABC Elite, Vector Laboratories) at a concentration of $9\mu\text{l}$ per 1ml PBS was applied for one hour and washed out. Diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich) was used as chromogene at the concentration of 0.025 mg/ml in distilled water and Tris-buffer with 0.01% H_2O_2 and 0.04% nickel chloride. After washing in PBS and distilled water, the free floating sections were mounted onto superfrost glass slides (Menzel), dehydrated in ascending concentrations of ethanol, cleared in ProTaq[®] Clear and coverslipped with ProTaq[®] PARAMount. The same blinded researcher analysed DAB-stained sections for BrdU-positive cells throughout the rostrocaudal extent of the granule cell layer in both hippocampi except for the uppermost focal layer. The resulting number was multiplied by six to obtain an estimation of the total number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus. Exemplary pictures of BrdU-positive cells were taken by differential interference contrast

(DIC)-microscopy (Olympus BX50). Unessential parts of the pictures were removed, but no further manipulation occurred.

Immunofluorescence staining and analysis. To determine the phenotype of the newborn cells, one-in-a-12 series (480 μ m apart) of the sections were double- or triple-labelled by the proliferating marker BrdU, the marker for mature neurons NeuN or marker for premature neurons Doublecortin, GFP for nestin-staining, and GFAP. After DNA denaturation, rinsing in borate buffer and blocking of unspecific antibody binding as described above, the sections were incubated overnight with the primary antibody diluted in PBS+ in the following concentrations: anti-BrdU 1:500 (rat, AbD Serotec), anti-NeuN 1:100 (mouse, Millipore), anti-GFP 1:250 (rabbit, Abcam), anti-Doublecortin 1:200 (goat, Santa-Cruz), anti-GFAP 1:200 (goat, Santa-Cruz). The next day, sections were rinsed followed by blocking with PBS+, and incubated with the secondary antibodies diluted in PBS+ at room temperature for four hours. The following secondary fluorochrome antibodies and concentrations were used: anti-rat Rhodamine X, 1:250 (Dianova), anti-mouse Alexa 488, 1:1000 (Invitrogen), anti-rabbit Alexa 488, 1:1000 (Invitrogen), anti-goat Alexa 647, 1:100 (Invitrogen). After incubation, sections were washed, mounted, dehydrated, cleared, and coverslipped. Immunofluorescence stained sections were analysed by taking confocal z-stacks scanned at 1 μ m intervals using a Leica TCS SP2. Fifty randomly selected BrdU-positive cells within the granule cell layer were investigated for co-expression of additional neuronal marker. The ratio of the neuronal phenotypes was multiplied by the total number of BrdU-positive cells and yielded an estimation of the absolute numbers of newborn neurons within the granule cell layer.

Behavioural testing and analysis. To assess spatial memory, a total of forty-one mice (CTR: N = 10, IND: N = 11, ENR: N = 10, DIR: N = 10) were tested in a modified reversal learning version of the Morris water maze as described previously¹⁵. For five consecutive days, mice were trained to navigate through opaque water to a hidden platform 1 cm below the surface of a circular tank (1.2m diameter). The temperature was kept constant at 19°C to 20°C. Every day consisted of six trials with a maximum duration of 120 seconds and an inter-trial interval time of 30 minutes. The starting position changed daily, but was kept constant during the day (Fig. 3D). The platform was relocated into the opposite quadrant on day four. In case a mouse failed to find the platform, it was guided to the platform and remained there for 15 seconds. Animals were tracked and recorded by Viewer³ (Biobserve). The lengths of the swim paths to target and the number of crossings of the previous target zone were automatically analysed by Viewer³. To investigate qualitative properties of the learning in the Morris water maze, classification and analysis of search strategies were performed. Therefore, the recorded xy-coordinates were transferred into a Matlab-script (Mathworks, USA) and automatically analysed based on the algorithm elaborated previously¹⁵. Search strategies were classified as spatial or non-spatial strategies and chi-square-independence test was used to determine if groups performed more or less often spatial or non-spatial strategies as expected. Furthermore, the xy-coordinates were used to depict the spatial preference of the mice in heat maps of presence probability drafted automatically by the Matlab-script.

Statistical analysis and data presentation. Statistical analysis was performed in SPSS 21. The metric variables “number of cells” and “crossing of platform” were analysed with one-way ANOVA while the metric variable “length of swim path” was analysed using repeated measures ANOVA. For comparison between groups, post-hoc tests were used when main analysis revealed significance and Levene’s test was performed to validate homogeneity of variances. Bonferroni-correction was chosen for post-hoc analysis in case of variance homogeneity and Tamhane’s-T2 was selected in case of variance inhomogeneity. To determine an association between housing condition and the nominal variable hippocampal-dependent search strategy respectively hippocampal-independent search strategy the chi-square-independence test was applied. Therefore, the different search strategies were classified as hippocampal-dependent “spatial” strategies or as hippocampal-independent “non-spatial” strategies. According to the literature, the following strategies were defined as “spatial”: “directed search”, “focal search”, “direct swimming” while the following strategies were defined as “non-spatial”: “thigmotaxis”, “random search”, “scanning”, “chaining”^{15,27}. Likewise, chi-square-test was selected for assessment of “perseverance” and its association with housing conditions. For all applied statistical tests, the level of significance was set to the conventional level of 0.05. Absolute numbers of cells (Fig. 2B,C,E) and absolute numbers of platform crossings (Fig. 3A) are presented as boxplots with a center line as median, Tukey-style whiskers extend 1.5 times the interquartile range from 25th and 75th percentiles. The length of the swim path to reach the hidden platform is presented as mean+ s.e.m (Fig. 3B).

References

1. Kempermann, G., Kuhn, H. G. & Gage, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* **386**, 493–495 (1997).
2. Van Praag, H., Kempermann, G. & Gage, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neurosci* **2**, 266–270 (1999).
3. Fabel, K. *et al.* Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Front. Neurosci* **3**, doi: 10.3389/neuro.22.002.2009 (2009).
4. Kempermann, G., Kuhn, H. G. & Gage, F. H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J. Neuroscience* **18**, 3206–3212 (1998).

5. Van Praag, H., Christie, B. R., Seinowski, T. J. & Gage, F. H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 13427–13431 (1999).
6. Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O. & Eriksson, P. S. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J. Neurobiol.* **39**, 569–578 (1999).
7. Laurin, D., Verreault, R., Lindsay, J., MacPherson, K. & Rockwood, K. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch. Neurol.* **58**, 498–504 (2001).
8. Radak, Z. *et al.* Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **20**, 777–783 (2010).
9. Freund, J. *et al.* Emergence of individuality in genetically identical mice. *Science* **340**, 756–759 (2013).
10. Rosenzweig, M. R., Bennett, E. L., Herbert, M. & Morimoto, H. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environment. *Brain. Res.* **153**, 563–576 (1978).
11. Atienza, A. A. *et al.* Identifying sedentary subgroups: The NCI health information national trends survey. *Am. J. Prev. Med.* **31**, 383–390 (2006).
12. Lesemann, A. *et al.* MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. *Brain. Res.* **1457**, 51–69 (2012).
13. Yamaguchi, M., Saito, H., Suzuki, M. & Mori, K. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport* **11**, 1991–1996 (2000).
14. Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B. & Kronenberg, G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosc.* **27**, 447–52 (2004).
15. Garthe, A., Behr, J. & Kempermann, G. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One* **4**, e5464, doi: 10.1371/journal.pone.0005464 (2009).
16. Freund, J. *et al.* Association between exploratory activity and social individuality in genetically identical mice living in the same enriched environment. *Neuroscience*. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.027 (2015).
17. Ferchik, P. A. & Bennett, E. L. Direct contact with enriched environment is required to alter cerebral weights in rats. *J. Comp. Physiol. Psych.* **88**, 360–367 (1975).
18. Held, R. & Hein, A. Movement-produced stimulation in the development of visually guided behaviour. *J. Comp. Physiol. Psych.* **56**, 872–876 (1963).
19. Bednarczyk, M. R. *et al.* Distinct stages of adult hippocampal neurogenesis are regulated by running and the running environment. *Hippocampus* **21**, 1334–1347 (2011).
20. Kim, Y. *et al.* Association between various sedentary behaviours and all-cause, cardiovascular disease and cancer mortality: the Multiethnic Cohort Study. *Int. J. Epidemiol.* **42**, 1040–1056 (2013).
21. Wilmot, E. G. *et al.* Sedentary time in adults and the association with diabetes, cardiovascular disease and death: systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* **55**, 2895–2905 (2012).
22. Sund, A. M., Larsson, B. & Wichstrøm, L. Role of physical and sedentary activities in the development of depressive symptoms in early adolescence. *Soc. Psychiatry. Psychiatr. Epidemiol.* **46**, 431–441 (2011).
23. Lindstrom, H. A. *et al.* The relationships between television viewing in midlife and the development of Alzheimer's disease in a case-control study. *Brain and Cognition* **58**, 157–165 (2005).
24. Bilimoria, P. M., Hensch, T. K. & Bavelier, D. A mouse model for too much TV? *Trends Cogn. Sci.* **16**, 529–531 (2012).
25. Cummins, R. A., Livesey, P. J. & Evans, J. G. A developmental theory of environmental enrichment. *Science* **197**, 692–694 (1977).
26. Christakis, D. A., Ramirez, J. S. B. & Ramirez, J. M. Overstimulation of newborn mice leads to behavioural differences and deficits in cognitive performance. *Sci. Rep.* **2**, 546, doi: 10.1038/srep00546 (2012).
27. Garthe, A., Huang, Z., Kaczmarek, L., Filipkowski, R. K. & Kempermann, G. 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 and Behavior* **13**, 357–364, doi: 10.1111/gbb.12130 (2014).

Acknowledgments

We thank Jennifer Altschüler for technical assistance. This study was funded by a grant from Else Kröner-Fresenius-Stiftung to B.S.

Author Contributions

D.I. performed the animal experiments and the data-analysis and wrote the manuscript, C.K. conducted the behavioral testing, A.G. provided the analytical tools for the behavioral testing, Y.W. supported behavioral testing and manuscript revision, G.K. initiated the study, provided the equipment for the experiment and wrote the manuscript, B.S. conceived and designed the study and wrote the manuscript.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Iggena, D. *et al.* Only watching others making their experiences is insufficient to enhance adult neurogenesis and water maze performance in mice. *Sci. Rep.* **5**, 14141; doi: 10.1038/srep14141 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

<https://doi.org/10.1111/jpi.12397>

<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.03.002>

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.02.040>

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

Komplette Publikationsliste

1. **Deetje Iggena**, York Winter, Barbara Steiner. Melatonin restores hippocampal neural precursor cell proliferation and prevents cognitive deficits induced by jet lag simulation in adult mice. *Journal of Pineal Research*. 2017; 62(4) pp: e12397
Impact-Factor: 9.3
2. **Deetje Iggena**, Charlotte Klein, Alexander Garthe, York Winter, Gerd Kempermann, Barbara Steiner. Only watching others making their experiences is insufficient to enhance adult neurogenesis and water maze performance in mice. *Scientific Reports*. 2015;5: 14141
doi: 10.1038/srep14141.
Impact-Factor: 5.2
3. Charlotte Klein, Wenke Jonas, **Deetje Iggena**, Laura Empl, Marion Rivalan, Petra Wiedmer, Joachim Spranger, Rainer Hellweg, York Winter, Barbara Steiner: Exercise prevents high-fat diet-induced impairment of flexible memory expression in the water maze and modulates adult hippocampal neurogenesis in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2016; 131: 26 – 35
Impact-Factor: 3.4
4. Charlotte Klein, Justyna U Rasinska, Laura Empl, Maria Sparenberg, Poshtiban Anahita, Elisabeth G Hain, **Deetje Iggena**, Marion Rivalan, York Winter, Barbara Steiner: Physical exercise counteracts MPTP-induced changes in neural precursor cell proliferation in the hippocampus and restores spatial learning but not memory performance in the water maze. *Behavioral Brain Research*. 2016;307: 227 – 238
Impact-Factor: 3.0
5. Sven Diederichs, Lorenz Bartsch, Julia C. Berkmann, Karin Fröse, Jana Heitmann, Caroline Hoppe, **Deetje Iggena**, Danny Jazmati, Philipp Karschnia, Miriam Linsenmeier, Thomas Maulhardt, Lino Möhrmann, Johannes Morstein, Stella Paffenholz, Jacqueline Platzek, Paula Röpenack, Timo Rückert, Ludger Sandig, Maximilian Schell, Anna Steinmann, Gjendine Voss, Maria E. Weinberger, Ramona Wullenkord: The dark matter of the cancer genome: Aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations. *EMBO Molecular Medicine*. 2016;8(5): 442 – 457
Impact-Factor: 9.5

6. Harald Prüß, **Deetje Iggena**, Tina Baldinger, Vincent Prinz, Andreas Meisel, Matthias Endres, Ulrich Dirnagl, Jan M. Schwab: Evidence of Intrathecal Immunoglobulin Synthesis in Stroke. A Cohort Study. JAMA Neurology, 2012, 69(6): 714 – 717
Impact-Factor: 7.2

Danksagung

Ich möchte mich bei meiner wissenschaftlichen Betreuerin und Doktormutter Frau PD Dr. med. Barbara Steiner für die freundliche Überlassung des Themas und die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe „Neurale Regeneration und Plastizität“ bedanken. Sie hat mich stets wissenschaftlich und freundschaftlich unterstützt, meine Ideen begrüßt und mich zielsicher durch diese Arbeit begleitet. Vielen Dank für die jahrlange lehrreiche und produktive Zusammenarbeit, sowie für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Jennifer Altschüler und Charlotte Klein für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die kollegiale Zusammenarbeit sowie bei allen weiteren heutigen und ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, auf die ich mich stets verlassen konnte. Außerdem möchte ich mich bei Prof. Gerd Kempermann und Dr. Alexander Garthe vom CRTD Dresden als stets zuverlässige Kooperationspartner bedanken.

Mein weiterer Dank gilt meiner Familie und meinen Freund*innen, deren kontinuierliche Unterstützung, Interesse und Gespräche diese Arbeit erst ermöglicht haben. Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Lebenspartner Florian Knobloch, der mir stets mit Rat und einem offenen Ohr zur Seite stand.