Aus dem Zentrum für Neurologie und Psychiatrie der Universität zu Köln Klinik
und Poliklinik für Neurologie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

Einfluss von Enriched Environment und Ernährung auf die funktionelle Rehabilitation anhand molekularbiologischer Analysen in einem *in vivo* Modell der zerebralen Ischämie

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Valentina Laetitia Zimmermann
aus Bühl

promoviert am 14.09.2026

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln,
2026

Dekan:	Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter:	Universitätsprofessor Dr. med. M. Schroeter
2. Gutachterin:	Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. T. Mikhailovna

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Universitätsprofessor Dr. M. Schroeter, Leiter der AG Experimentelle Neuroimmunologie
Frau Dr. Anne Ladwig, Abteilung für Neurologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Der dieser Arbeit zugrunde liegende Datensatz wurde ohne meine Mitarbeit am Cologne Center for Genomics (CCG), Universität zu Köln, Weyertal 115b, 50931 Köln, Deutschland, (E-Mail: ccg-office@uni-koeln.de), sowie von Frau Ulrike Göbel vom Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt.

Die Experimente, die dieser Arbeit zugrunde liegen, nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. M. Schroeter wurden von mir mit Unterstützung von Frau Dr. Anne Ladwig und dem ehemaligen medizinischen Doktoranden Johannes Romer ausgeführt.

Die verwendeten Datensätze wurden von mir eigenständig ausgewertet.

Die Betreuung der Mäuse erfolgte im CECAD Forschungszentrum in Köln. Frau Gina Pieper war als Tierpflegerin zuständig und Paul Friedmann Pohlig, Operations Manager in vivo Research Facility, war der Leiter der Tierhaltung. Die Entnahme des Kleinhirns wurde von Frau Dr. Anne Ladwig durchgeführt. Die Anfertigung der Hirnschnitte sowie die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ladwig und Herrn Johannes Romer. Die Auswertung der Verhaltenstests erfolgte durch mich selbständig und unter Verblindung.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:
Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 17.04.2026

Unterschrift: .....

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen nachstehenden Personen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben. Besonders danke ich der Forschungsgruppe, mit der wir im Labor zusammengearbeitet haben, für die tolle Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung. Mein Dank gilt dem Cologne Center for Genomics (CCG), Universität zu Köln, für die professionelle Unterstützung bei der Bibliothekspräparation und Sequenzierung im Rahmen der mRNA-Sequenzierung.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meiner Betreuerin, Frau Dr. Anne Ladwig, die mich während des gesamten Projekts mit ihrem Fachwissen/Erfahrung und unermüdlichen Motivation stets unterstützt hat. Während des gesamten Projekts hat sie mich mit Engagement und großer Hilfsbereitschaft begleitet. Sie hat mir nicht nur umfangreiche Kenntnisse in den relevanten wissenschaftlichen Forschungsbereichen und methodische Fähigkeiten vermittelt, sondern mir auch das Vertrauen geschenkt, alle Herausforderungen des Forschungsprozesses meistern zu können. Anne ist nicht nur fachlich äußert kompetent, sondern zeichnet sich auch durch eine bemerkenswerte Empathie und Geduld aus. Die Betreuung durch meine Betreuerin war in jeder Hinsicht optimal und ich bin sehr dankbar für die Möglichkeit, in einem so spannenden und wichtigen Forschungsfeld tätig gewesen zu sein.

Meinen Dank richte ich auch an meinen Doktorvater Dr. Michael Schroeter, der uns während der gesamten Forschung viel Freiraum und Vertrauen geschenkt hat. Seine engagierte Betreuung, seine wertvolle Hilfe und seine zahlreichen Impulse haben wesentlich dazu beigetragen, dass wir unser Projekt eigenständig entwickeln konnten, ohne den von ihm vorgegebenen Rahmen zu verlassen.

Des Weiteren möchte ich meinem Studienkollegen Johannes Romer danken. Er hat zum Erfolg dieses Projektes beigetragen und sein Teilprojekt erfolgreich abgeschlossen. Wir haben vielfach gemeinsam im Labor gearbeitet, uns stets gegenseitig unterstützt und voneinander gelernt. Besonders hervorheben möchte ich den Spaß und die Freude, die wir an der wissenschaftlichen Arbeit gemeinsam erlebt haben und die diese Zeit für mich besonders bereichert haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets mit Unterstützung, Liebe und Vertrauen begleitet haben. Durch ihre Geduld, Ermutigung und ihr Verständnis haben sie mir stets den Rücken gestärkt und mir so den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit ermöglicht.

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 9

1. ZUSAMMENFASSUNG 11

2. EINLEITUNG 13

2.1. Epidemiologie 13

2.2. Akutbehandlung 13

2.3. Risikofaktoren und ihr Einfluss auf die Entstehung und das Outcome von Schlaganfälle 14

2.4. Zelluläre Mechanismen nach Schlaganfall 15

2.5. Enriched Environment: Stärkung zellulärer, molekularer und epigenetischer Mechanismen im ZNS 17

2.6. Enriched Environment und körperliche Aktivität als modulierende Faktoren der funktionellen Erholung nach Schlaganfall 21

2.7. EE als Konzept in der Klinik 22

2.8. Genetische und epigenetische Besonderheiten des Kleinhirns und ihre Modulierbarkeit durch Umweltfaktoren 24

2.9. Das Kleinhirn und seine Rolle als Schlüsselakteur in der Rehabilitation nach Schlaganfall. Crossed Cerebellar Diaschisis: Mechanismen und therapeutische Ansätze 25

2.10. Fragestellungen und Ziel der Arbeit 26

3. METHODEN UND MATERIAL 28

3.1. Methoden 28

3.1.1. Vorbereitung 28

3.1.1.1. Versuchsaufbau 28

3.1.1.2. Gewebeentnahme 31

3.1.2. Eigene experimentelle Untersuchungen 32

3.1.2.1. Funktionelle Testung mittels Neuroscore 32

3.1.2.2. Immunhistochemische Färbung 34

3.1.2.3. RNA-Extraktion 36
3.1.2.3.1. Bestimmung der RNA-Konzentration 37
3.1.3. Auswertung 38
3.1.3.1. Bildgebung und Bearbeitung 38
3.1.3.2. mRNASeq mittels Illumina 38
3.1.3.3. Statistik – Neuroscore 38
3.1.3.3.1. Shrinkage Methoden der DESeq2 Daten in R 39
3.1.3.3.2. Principal Component Analysis und Sample Distance Plot 40
3.1.3.3.3. Volcano Plots 40
3.1.3.3.4. KEGG-pathway- und GSEA-Analyse 41
3.1.3.3.5. GOCC-Gene Ontology Cellular Component 42

3.2. Materialliste 43
3.2.1. Substanzen und Lösungen/Chemikalien 43
3.2.2. Geräte 44
3.2.3. Computerprogramme/Software 44
3.2.4. Antikörper 45
3.2.5. Fluoreszenzfarbstoff 45

4. ERGEBNISSE 46

4.1. Vorarbeiten/Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen 46

4.2. Gewichtsverlust nach Schlaganfall ist am stärksten ausgeprägt in der EE HFD Gruppe 50

4.3. EE-Tiere haben ein funktionell besseres Outcome nach Schlaganfall 51

4.4. EE begrenzt die Entzündung und schützt die umliegenden Neurone 54

4.5. RNA-Sequenzierung des Kleinhirns 56
4.5.1. Vorauswertung: Sample distance plot 56

4.6. Apeglm und Ashr-Methode: Identifizierung der am stärksten von EE beeinflussten Gene 57

4.7. KEGG-Pathway Analyse: EE beeinflusst vor allem Gene für oxidative Phosphorylierung und ribosomale Proteine 74

4.8. GSEA-Analyse: Enrichment für ribosomale Gene unter EE 81

5. DISKUSSION 85

5.1. Methodische Limitationen des Modells 85

5.2. Gewichtsreduktion nach Schlaganfall: Ursachen und Konsequenzen 87

5.3. Funktionelle Erholung durch EE-Intervention nach Schlaganfall 89

5.4. Modulation von Entzündungszellen und neuronalen Prozessen durch EE im Periinfarktareal 91

5.5. EE in Kombination mit HFD führt zu einer initial schlechteren Erholung 94

5.6. Transkriptomveränderungen im Kleinhirn unter EE-Bedingungen 94

5.7. Ribosomale und mitochondriale Genexpression als Reaktion auf EE 105

5.8. Limitationen und Übertragbarkeit 110

6. LITERATURVERZEICHNIS 112

7. ANHANG 136

7.1. Abkürzungsverzeichnis 136

7.2. Tabellenverzeichnis 137

8. VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN 138

Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
ALS	Amytrophe Lateralsklerose
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
ANOVA	Analysis of variance
Apeglm	Approximate Posterior Estimation for generalized linear model (GLM)
Ashr	adaptive shrinkage
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
CC	Control caging
Cb	Cerebellum
CSPG	Chondroitinsulfat-Proteoglykane
DNA	Desoxyribonucleic acid
EE	Enriched environment
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FDG	Fluordesoxyglukose
FDR	False Discovery Rate
GAT-1	GABA Transporter 1
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GLM	Generalized Linear Model
GLUT	Glucosetransporter
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GOCC	Gene Ontology Cellular Component
GTT	Glukosetoleranztest
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HFD	High fat diet
Iba1	Ionizing calcium binding adaptor protein 1
IL-1β	Interleukin-1beta
IL-6	Interleukin-6
ICH	Intracerebral hemorrhage (intrazerebrale Blutung)
ITT	Insulintoleranztest
Ig	Immunglobulin
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
M1	proinflammatorischer Mikroglia-Aktivierungszustand
M2	antiinflammatorischer Mikroglia-Aktivierungszustand

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
NCD	Normal chow diet
NeuN	Neuronal nuclei
NES	Normalized Enrichment Score
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGS	Normal Goat Serum
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NLRP3	Nod-like-Rezeptor-Familie, Pyrin-Domäne-haltend 3
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
P	Punkte
p-value	p-Wert
padj	adjusted p-value
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PT	Photothrombose
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	Ethanolhaltiger Waschpuffer (QIAGEN)
RW1	Guanidinhaltiger Waschpuffer (QIAGEN)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Standardfehler
Tx	TritonX
tDCS	transkranielle Gleichstromstimulation
TMS	transkranielle Magnetstimulation
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZMMK	Zentrum für Molekulare Medizin

1. Zusammenfassung

Schlaganfälle verursachen häufig anhaltende neurologische Defizite, sodass Strategien zur Förderung der funktionellen Erholung und neurobiologischer Reparaturprozesse von hoher Relevanz sind. Modifizierbare Lebensstilfaktoren wie Bluthochdruck, Übergewicht, Diabetes und Nikotinabusus machen einen Großteil des Risikoprofils für die Entstehung und die Erholung von Schlaganfällen aus. Enriched Environment (EE) ist ein Modell für einen aktiven, kognitiv und sozial stimulierenden Lebensstil und kann neuroprotektive sowie plastizitätsfördernde Prozesse aktivieren.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss eines aktiven Lebensstils mit sportlicher Aktivität im Rahmen von EE unter Normalkost (NCD) und fettreicher Kost (HFD) auf die funktionelle Erholung nach einem photothrombotisch induzierten kortikalen Schlaganfall im Mausmodell zu untersuchen. Genomische Einflüsse von Lebensstilfaktoren und Diät wurden im nicht primär ischämisch geschädigten Kleinhirn analysiert.

Männliche Mäuse wurden unter Kontrollbedingungen (CC) oder EE gehalten und erhielten entweder eine NCD oder eine HFD. Nach sechs Wochen Intervention wurde eine Photothrombose induziert. Die phänotypische Erholung wurde mittels eines standardisierten Neuroscores erfasst. Korrelierend dazu wurden immunhistochemische Analysen des Schlaganfalls sowie eine Transkriptomuntersuchung des Kleinhirns mittels Illumina-basierter mRNA-Sequenzierung durchgeführt. Die differenzielle Genexpression wurde mit DESeq2 analysiert, während die funktionellen Pathway-Analysen unter Anwendung von Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) sowie Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)- und Gene Ontology Cellular Component (GOCC)-Ansätzen erfolgten.

Die Kombination aus EE und NCD führte zu der besten klinischen Erholung nach einem Schlaganfall. EE zeigte auch unter HFD protektive Effekte, indem ein anhaltender Gewichtsverlust verhindert und bessere klinische Verläufe im Vergleich zu Kontrollbedingungen erzielt wurden, wobei die Erholung im Vergleich zur EE-NCD-Gruppe verzögert war.

Auf immunzytochemischer Ebene war die verbesserte funktionelle Erholung unter EE mit einer räumlich begrenzten Entzündungsreaktion korreliert. Durch die EE und Diät-Interventionen waren genomisch Modulationen im Kleinhirn festzustellen, insbesondere in Genen, die an der mitochondrialen Energieversorgung, der ribosomalen Proteinsynthese sowie an anti-inflammatorischen, neuroprotektiven und reparativen Signalwegen beteiligt sind.

Insgesamt belegen die Ergebnisse, dass EE-vermittelte körperliche Aktivität die Erholung nach ischämischem Schlaganfall signifikant verbessert, während ein ungünstiges Ernährungsprofil diese Effekte abschwächen kann, und unterstreichen die Bedeutung eines multimodalen Lebensstilkonzepts aus Bewegung und ausgewogener Ernährung für eine optimale Rehabilitation.

2. Einleitung

2.1. Epidemiologie

Zerebrale Ischämien stellen in Industrienationen die häufigste Ursache für eine anhaltende Behinderung im Erwachsenenalter dar [1]. Jährlich erleiden etwa 12,2 Millionen Menschen weltweit einen Schlaganfall [2], sodass diese Erkrankung die zweithäufigste Todesursache darstellt [3]. Innerhalb des ersten Jahres nach einem Schlaganfall starben etwa ein Viertel bis ein Drittel der Betroffenen [4,5]. 40 Prozent der Überlebenden bzw. übrigen Erkrankten sind langfristig in ihren alltäglichen Aktivitäten beeinträchtigt [6–8]. Bis zum Jahr 2050 wird die Zahl der jährlichen Todesfälle durch Schlaganfall weltweit voraussichtlich um 50 % ansteigen – von 6,6 Millionen im Jahr 2020 auf etwa 9,7 Millionen [9].

Das motorische Defizit nach einem Schlaganfall erschwert das alltägliche Leben in besonderem Maße. Zudem ist es mit hohen Gesundheitskosten verbunden und stellt somit den Hauptgrund für die mit dem Schlaganfall verbundenen Gesundheitsausgaben dar [10]. Weltweit werden rund 34 % der Gesundheitsausgaben für die Behandlung von Schlaganfallpatienten ausgegeben. In Deutschland beliefen sich die Gesamtkosten für das erste Jahr nach einem erstmaligen ischämischen Schlaganfall pro Überlebenden auf 18.517 Euro. Die Lebenszeitkosten pro Fall liegen im Durchschnitt bei 43.129 Euro [11].

Des Weiteren können nach einer Ischämie gravierende kognitive Beeinträchtigungen, sogenannte nicht-motorische Folgen und Komplikationen wie Alzheimer und Depressionen auftreten, welche mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert sind [12,13]. Daher ist ein Fokus von Forschung und Gesundheitswesen auf die Prävention und Bewältigung der Langzeitfolgen von Schlaganfällen sowohl lebensqualitäts- als auch systemrelevant [6].

2.2. Akutbehandlung

Die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten in Form von Thrombolyse und Thrombektomie sind auf die ersten Stunden nach Beginn eines Schlaganfalls beschränkt. Diese führen zu einer signifikanten Reduktion der Morbidität und Mortalität. Obwohl die Reperfusionsrate durch endovaskuläre Thrombektomie bei Schlaganfallpatient:innen bis zu 71 % betragen kann, bleibt die Mortalität innerhalb von 90 Tagen nach dem Eingriff mit bis zu 15 % relativ hoch. Bei mehr als die Hälfte der Patient:innen zeigen sich weiterhin neurologische Defizite [14,15]. Die intravenöse Thrombolyse mit Gewebsplasminogenaktivator senkt das 3-Monats-Mortalitätsrisiko um 37 % (bei Durchführung innerhalb von 2 Stunden) bzw. um 26 % (bei Durchführung innerhalb von 2 bis 4,5 Stunden), die Thrombektomie reduziert das 3-

Monats-Mortalitätsrisiko um 28 %. Die medikamentöse Behandlung mit Thrombozytenaggregationshemmern und Antikoagulanzien zeigte mit 51 % eine noch stärkere Reduktion [16]. Eine zeitnahe Intervention in der Akutphase sowie eine konsequente antithrombotische Sekundärprophylaxe können für die Prognose bei Patient:innen mit ischämischem Schlaganfall entscheidend sein [16].

Im Gegensatz dazu zielen nicht-pharmakologische Therapieansätze wie die Physiotherapie auf eine Rehabilitation durch körperliche Aktivierung ab, wodurch eine Verbesserung der kognitiven, körperlichen und sozialen Fähigkeiten der Schlaganfallpatienten erreicht werden kann [17,18].

2.3 Risikofaktoren und ihr Einfluss auf die Entstehung und das Outcome von Schlaganfällen

Aktuelle Studien schätzen, dass bis zu 90 % aller Schlaganfälle auf beeinflussbare Risikofaktoren zurückzuführen sind, unabhängig von Region, Geschlecht, ethnischer Herkunft oder Altersgruppe [19]. Zu diesen beeinflussbaren Faktoren gehören u.a. Übergewicht, Diabetes, Bluthochdruck und Bewegungsmangel. Diese können aber nicht nur die Entstehung einer zerebralen Ischämie begünstigen, sondern bestimmen auch das Outcome [20,21]. Auch nach stattgehabten Schlaganfall können Lebensstiländerungen wie mehr Bewegung, Rauchverzicht, Erlernen gesunder Ernährungsgewohnheiten und Gewichtsreduktion im Sinne der Sekundärprävention das Risiko eines erneuten Infarkts um 80 % senken [22]. Eine weitere Studie zeigt, dass sich die kardiovaskuläre Mortalität bei Schlaganfallpatienten durch Lebensstiländerungen innerhalb von zehn Jahren um 85 bis 92 % senken lässt [23]. Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen steht die Zunahme dieser modifizierbaren Risikofaktoren in den vergangenen Jahrzehnten [20]. Zwischen 1990 und 2019 war ein hoher Body-Mass-Index der am schnellsten wachsende Risikofaktor für Schlaganfälle [2]. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass das Vorhandensein einer Vorerkrankung wie Diabetes mellitus bei einem Schlaganfall mit einer höheren Morbidität und Mortalität assoziiert ist [24,25]. Als maßgeblicher Risikofaktor für die Gruppe der jungen Erwachsenen kann insbesondere eine geringe körperliche Aktivität identifiziert werden, die laut Aigner und Kollegen für 59,7 % aller Schlaganfälle in dieser Altersgruppe verantwortlich ist [26]. Des Weiteren lässt sich eine Zunahme der Inzidenz von Typ-2-Diabetes im jüngeren Alter beobachten, was das Risiko für Schlaganfälle auch in dieser Altersgruppe erhöht [27]. Die weltlichen Veränderungen in der Landschafts- und Ernährungspolitik, der Ernährungsgewohnheiten, der körperlichen Aktivität und des Schlafs tragen zu diesem Aufwärtstrend bzw. der zunehmenden Diabetes-Epidemie bei [27].

2.4. Zelluläre Mechanismen nach Schlaganfall

Ein Schlaganfall entsteht, wenn die Blutzufuhr zu einem Areal im Gehirn zum Beispiel durch einen Gefäßverschluss plötzlich abbricht. Infolge der unterbrochene Blutversorgung kommt es zu einem plötzlichen Sauerstoffmangel, wodurch der Adenosintriphosphat (ATP)-Spiegel rapide abfällt. Dies hat den Verlust der Ionenhomöostase, eine Azidose, Zellschwellung sowie eine pathologischen Freisetzung von Glutamat, die Exzitotoxizität auslöst, zur Folge und führt letztlich zum Untergang neuronaler Zellen [28,29].

Zusätzlich beeinträchtigt eine Kalziumüberladung die Funktion der Mitochondrien, was zu einer erhöhten Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), einem energetischen Ungleichgewicht, oxidativem Stress und letztlich zu Apoptose und Nekrose führt [30].

Wenige Stunden bis mehrere Tage nach Schlaganfall kommt es zu einer starken Entzündungsreaktion, die sich global auf das Hirngewebe ausbreitet [28]. Diese Entzündungsprozesse spielen eine zentrale Rolle bei der sekundären Gewebeschädigung und tragen wesentlich zur Ausdehnung der Läsion sowie zu den neurologischen Beeinträchtigungen bei [31]. Das Ausmaß der durch den Schlaganfall hervorgerufenen Gewebeschädigung wird demnach maßgeblich durch das Immunsystem bestimmt [32,33]. Dadurch werden Gliazellen (Mikroglia und Astrozyten) aktiviert und etwas zeitversetzt hämatogene Zellen (Granulozyten, T-Zellen und Monozyten/Makrophagen) aus der Blutbahn rekrutiert. Mikroglia können sowohl pro-inflammatorisch (M1) als auch anti-inflammatorisch (M2) wirken [34–36]. M1- Mikroglia setzen proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor Alpha (TNF-α), Interleukin-1 beta (IL-1β), Interleukin-12 und Interleukin-6 (IL-6) sowie ROS und Stickstoffmonoxid (NO) frei, und schädigen so die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und beeinflussen die Neurogenese negativ [37]. M2-Mikroglia setzen entzündungshemmende Zytokine frei, fördern die Gewebereparatur, phagozytieren Zelltrümmer und tragen zur Wiederherstellung neuronaler Funktionen bei [29]. Beide Polarisationen der Mikroglia haben wichtige Funktionen. Tatsächlich scheinen M1 und M2 Zellen weniger als zwei grundlegend verschiedene Zelltypen als die Enden eines Spektrums von Polarisationsstufen darzustellen [36]. Allerdings kann eine überschießende M1-Antwort bzw. ein Ungleichgewicht zu einem schlechteren funktionellen Outcome führen [38,39]. Bei Diabetes mellitus Typ 2 werden durch die Hyperglykämie beispielsweise M1 Mikroglia befördert, was möglicherweise anteilig das schlechtere Outcome von Diabetes mellitus Typ 2 Patienten mit Schlaganfall erklärt [40]. Demnach liegt ein Fokus der Schlaganfallforschung auf der Förderung der neuroprotektiven und anti-inflammatorischen Mikroglia [32].

Die durch ROS erhöhte Neuroinflammation und die Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) führen zu einer erhöhten Permeabilität der BHS. Dadurch wird der Eintritt peripherer Immunzellen wie Neutrophilen, Monozyten, dendritischen Zellen und Lymphozyten ca. drei Tage nach Ischämiebeginn in das zentrale Nervensystem erleichtert und die lokale Entzündungsreaktion zusätzlich verstärkt [28,41].

Im geschädigten Hirngewebe differenzieren Monozyten zu Makrophagen. Diese phagozytieren abgestorbene Zellen und übernehmen sowohl entzündungsfördernde als auch reparative Funktionen. Während der späten subakuten bis chronischen Phase normalisieren sich die Monozyten im Blut und die Makrophagen unterstützen zunehmend den Gewebereparaturprozess. Die Immunreaktion erreicht ihren Höhepunkt in der Regel am dritten bis fünften Tag nach dem Schlaganfall [42].

Parallel zur Rekrutierung peripherer Immunzellen werden auch Astrozyten aktiviert. Diese Gliazellen reagieren auf die Gewebeschädigung mit Hypertrophie, Proliferation und einer vermehrten Expression von Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). Dies ist bereits ab dem dritten Tag und über Wochen bis Monate hinweg beobachtbar [43]. Darauf setzen die Astroglia wichtige Wachstumsfaktoren wie Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) und den vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) frei. Diese sind entscheidend für das Axonwachstum, die Synaptogenese sowie die Revaskularisierung des geschädigten Gewebes [31]. Sie fördern die neuronale Regeneration, indem sie trophische Faktoren und Lipide bereitstellen, und bilden die Glianarbe, die den Infarkt und die Ausbreitung der Entzündung begrenzt. Gleichzeitig kann diese Glianarbe jedoch die Regeneration von Nervenzellen behindern [29].

Einige Tage nach dem Schlaganfall folgt auf die schädlichen Ereignisse eine Phase der neurovaskulären Reparatur und Neuroplastizität. In dieser werden endogene Reparaturmechanismen aktiviert, darunter die Bildung neuer Synapsen, die Reorganisation neuronaler Netzwerke sowie Prozesse der Neurogenese und Angiogenese [35]. Diese Umbau- und Reparaturmechanismen können über Wochen bis Monate andauern.

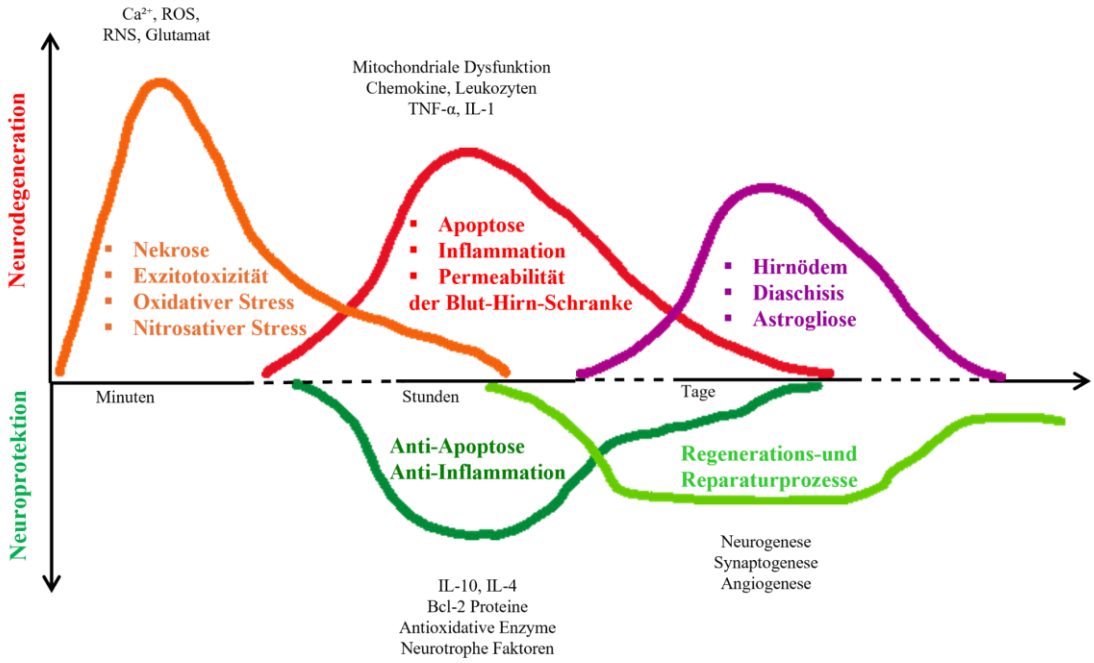


Abb. 1: Chronologische zelluläre und molekulare Folgen eines ischämischen Schlaganfalls. Nach einem ischämischen Schlaganfall kommt es zu einer raschen Entstehung von Exzitotoxizität, Nekrose, oxidativem und nitrosativem Stress. Später (innerhalb von Stunden bis zu einigen Tagen) kommt es zu Apoptose, Neuroinflammation, Permeabilisierung der BHS, Diaschisis und Astroglioses [44,45] *Quelle: Adaptiert nach Mollet et al., 2022*

2.5. Enriched Environment: Stärkung zellulärer, molekularer und epigenetischer Mechanismen im Zentrales Nervensystem (ZNS)

Enriched environment (EE) ist ein experimentelles Konzept für Tierversucher mit Nagern, in welcher ein aktiver und sozialer Lebensstil imitiert wird. In zahlreichen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass EE aus zellulärer Sicht neuroprotektiv wirkt, zelluläre und synaptische Plastizität sowie funktionelle Leistungsfähigkeit fördert [46–48]. Diese Anreicherung der Umgebung umfasst Maßnahmen, die zusätzliche Reize bieten und somit die soziale Interaktion, das Spielverhalten, die Erkundung, die Lernprozesse, die Gedächtnisbildung und die körperliche Aktivität fördern [49]. EE ist ein flexibles Konzept, das je nach Studienvorhaben unterschiedlich gestaltet werden kann. Das Ziel ist jedoch immer die Stimulation auf unterschiedlichen Sinnesebenen, bei der motorische, kognitive und sensorische Komponenten einbezogen werden (Abb. 2) [50]. Im Mausmodell sind die Käfige beispielsweise größer, um mehr Erkundungsraum zu bieten, für die visuelle Anregung können unterschiedlich farbige Gegenstände (Tunnel, Ebnen, Igloos, …) vorhanden sein, kognitiv können Hindernisse eingebaut und deren Position geändert werden,

auditorisch kann mit Musik oder unterschiedlichen Geräuschen gearbeitet werden, sensorisch können Materialien verwendet werden mit unterschiedlicher Oberfläche und Beschaffenheit, für die soziale Stimulation können die Tiere in größeren Gruppen gehalten werden, auch unterschiedliche Gerüche können genutzt werden und für die motorische Aktivität können Laufräder, Leitern, u.a. Sportgeräte enthalten sein. Die konkrete Gestaltung des EE richtet sich jeweils nach der Zielsetzung der Studie und kann entsprechend angepasst werden [51,52].

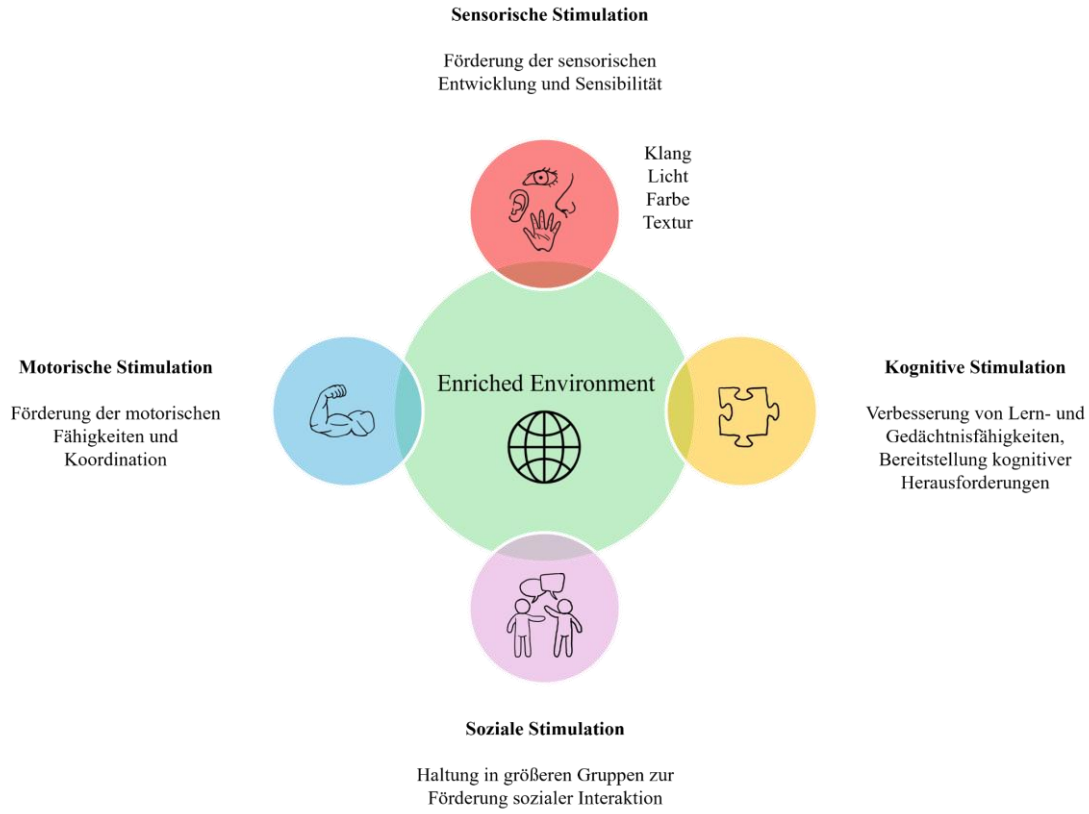


Abb. 2: Klassifikation der verschiedenen Stimulationstypen innerhalb EE im Tiermodell, die Bereiche umfassen kognitive, sensorische (taktil, olfaktorisch, visuell, auditiv), soziale und motorische Stimulation [53]

EE wirkt auf mehreren Ebenen neuroprotektiv und fördert die funktionelle Erholung. Dabei lassen sich die Effekte in makroskopische, molekulare und epigenetische unterteilen (Abb. 3).

Auf makroskopischer Ebene zeigt sich eine Zunahme des Gehirngewichts, einer Verbreiterung des Kortex, einer Verzweigung dendritischer Strukturen, einer verstärkten Synapsenbildung und hippocampale Neurogenese sowie einer verbesserten Integration

neu gebildeter Zellen in bestehende Netzwerke [54–57]. Darüber hinaus fördert körperliche Aktivität die Angiogenese [58,59].

Eine langfristige Umweltanreicherung führte bei gealterten Mäusen zu einer Hypertrophie der Mikroglia mit vermehrten und verlängerten Zellverzweigungen in verschiedenen Hirnregionen (Hippocampus, Hypothalamus, Amygdala) jedoch ohne Hinweise auf Proliferation oder Entzündung. Die verminderte Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC II) weist auf einen homöostatischen Mikroglia-Phänotyp hin. Dieser trägt vermutlich zur Aufrechterhaltung der neuronalen Homöostase und Neuroprotektion bei [60].

Gao und seine Kolleg:innen zeigten, dass EE die Proliferation und Aktivierung Gliazellen fördert, was zu einer verstärkten Myelinisierung führt. Dieser Prozess trägt maßgeblich zur Verbesserung kognitiver Funktionen bei. EE stellt somit eine wirksame, nichtinvasive Stimulationsstrategie dar, die im Gegensatz zu invasiven Ansätzen wie Stammzelltransplantationen effektiv zur Förderung der Myelinisierung und zur Unterstützung von Reparaturprozessen im ZNS eingesetzt werden kann [61].

EE beeinflusst auch verschiedene molekulare Prozesse im Gehirn. So konnte durch EE eine erhöhte Konzentrationen des aus dem Gehirn stammenden neurotrophen Faktors (BDNF) im Hippocampus und im Kleinhirn [62,63], höhere Konzentrationen des Nervenwachstumsfaktors und Neurotrophin-3 in verschiedenen Bereichen Hirnareale [64] und unter anderem eine Erhöhung der Spiegel sowohl prä- als auch postsynaptischer Proteine, wie Synaptophysin und Postsynaptic Density Protein 95 (PSD-95), in mehreren Regionen des Gehirns beobachtet werden [65]. Ergänzend hierzu konnte gezeigt werden, dass EE die Spiegel und die Expression der Rezeptoren verschiedener Neurotransmitter wie beispielsweise Serotonin, Acetylcholin und Noradrenalin, die eine zentrale Rolle für die Neuroplastizität spielen, erhöht [66,67]. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass EE die Expression glutamaterger Rezeptoren, insbesondere der NMDA- und AMPA-Rezeptoren, verstärkt [68,69].

Ergänzend hierzu konnte gezeigt werden, dass EE oxidative Stressmarker wie Superoxidanionen, ROS, Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (4-HNE) im ZNS signifikant reduziert und gleichzeitig sowohl enzymatische antioxidative Systeme (z. B. Superoxiddismutase (SOD), Katalase (CAT), Glutathion-S-Transferase (GST)) als auch nicht-enzymatische antioxidative Abwehrmechanismen (z. B. reduziertes Glutathion (GSH), oxidiertes Glutathion (GSSG) und das GSH/GSSG-Verhältnis) stärkt [70].

Zudem zeigte sich unter EE eine signifikante Hochregulation von Proteinen, die mit der mitochondrialen Biogenese in Zusammenhang stehen, die zu einer verbesserten mitochondrialen Funktion führen kann [71].

EE hat auch stimulierende Effekte auf epigenetischer Ebene [72]. EE beeinflusst die Genexpression durch epigenetische Modifikationen, insbesondere durch Veränderungen der Histonacetylierung und Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Methylierung [53]. Eine verstärkte Histonacetylierung führt zu einer aufgelockerten Chromatinstruktur, die die Transkription von Genen erleichtert, die mit Zellwachstum, -entwicklung und Neuroplastizität unter ungünstigen Umweltbedingungen assoziiert sind [72]. Aktuelle Forschungsergebnisse belegen, dass EE die neuronale Aktivität steigert und dadurch einen Ca^{2+}-Einstrom – vor allem in Spinalganglienzellen – hervorruft. Dieser wiederum aktiviert das CREB-Bindungsprotein, welches eine verstärkte Histonacetylierung vermittelt. Dies wiederum erhöht die Expression von regenerationsfördernden Genen und fördert die axonale Regeneration [73]. In der Studie von Zhang et al. (2018) wird gezeigt, dass EE die transkriptionelle und epigenetische Differenzierung in der DNA-Methylierung zwischen dem dorsalen und ventralen Gyrus dentatus der Maus signifikant verstärkt, insbesondere an Bindungsstellen des NeuroD1-Transkriptionsfaktors, ein Regulator der adulten Neurogenese [74].

Eine Studie von Morse et al. (2015) zeigte, dass altersbedingte Gedächtnisdefizite mit einer Dysregulation der Histon-Lysin-Methylierung im Hippocampus assoziiert sind. EE konnte diese Defizite abschwächen, indem sie die lerninduzierte Trimethylierung von Histon H3 an Lysin 4 (H3K4me3) am BDNF-Promotor IV normalisiert und die BDNF-Transkription im gealterten Hippocampus erhöht. Dadurch verbessert sich das hippokampusabhängigen Langzeitgedächtnis [75].

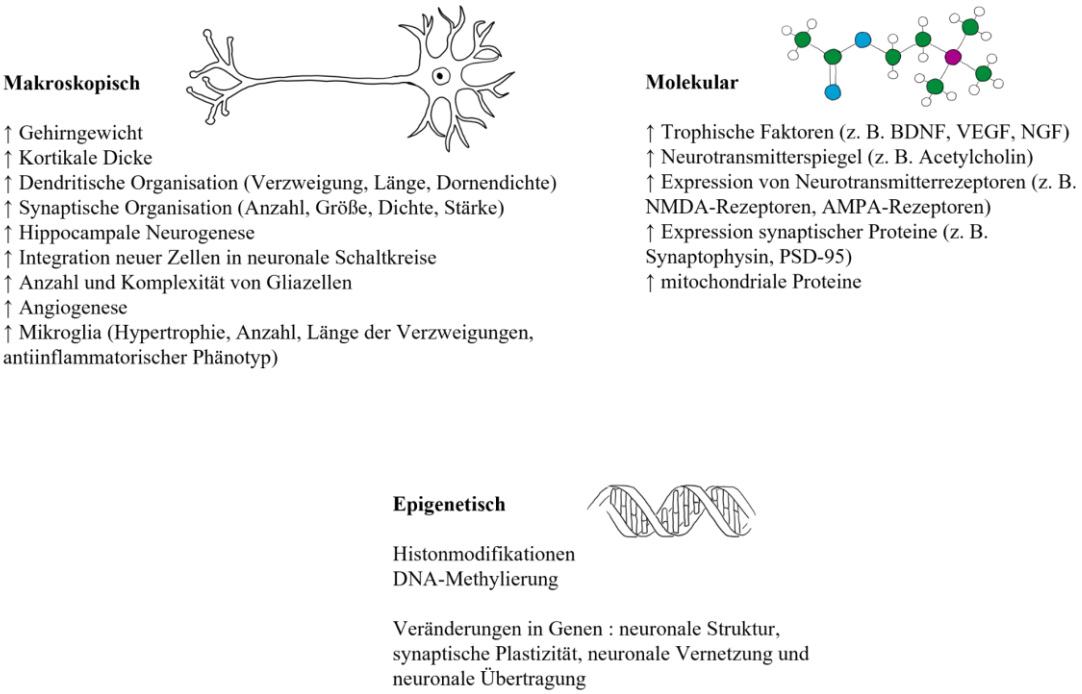


Abb. 3: EE führt zu makroskopischen, molekularen, epigenetischen Veränderungen im Gehirn, die die neuronale Plastizität fördern.

2.6. Enriched Environment und körperliche Aktivität als modulierende Faktoren der funktionellen Erholung nach Schlaganfall

Umgebung und Bewegung wirken nicht nur präventiv, sondern auch rehabilitativ und beeinflussen den Heilungsprozess maßgeblich. Der rehabilitative Effekt bezieht sich dabei vor allem auf die Verbesserung der funktionellen Erholung, insbesondere motorischer und kognitiver Funktionen, im subakuten bis chronischen Verlauf. Dieser Effekt wird durch eine gesteigerte neuronale Plastizität und die Bildung neuer neuronaler Verbindungen vermittelt [76].

EE verbessert dabei die adaptiven Plastizität des Gehirns [77]. Dies zeigt sich unter anderem in einer Zunahme dendritischer Verzweigungen und dendritischer Dornen [78,79]. Gleichzeitig erhöht EE die Expression trophischer Faktoren wie BDNF, Nervenwachstumsfaktor (NGF)-A und NGF-B, die das Überleben und Wachstum von Nervenzellen fördern [80,81]. Zusätzlich fördert EE die Gliogenese im ipsi- und kontralesionalen Kortex, insbesondere die Bildung von Astrozyten und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen/Polydendrozyten (NG2+), was die Reparationsprozesse nach Schlaganfall unterstützt [82]. EE steigert zudem die Anzahl neuraler Stammzellen und die Neurogenese im subventrikulären Ventrikel [83]. EE steigert die Expression des Sigma-1-Rezeptors im Periinfarktbereich, wodurch der zelluläre

Transport von Biomolekülen, einschließlich der synaptischen Proteine Neurabin und Neurexin, verbessert wird und damit die Umgestaltung neuronaler Netzwerke unterstützt [84]. Nach Schlaganfall fördert EE die neuronale Erregbarkeit, indem es die Funktion des Gamma- -Aminobuttersäure (GABA)-Transporters GAT-1 wiederherstellt. Dabei wird die GAT-1-vermittelte phasische GABA-Signalgebung gestärkt, während die pathologisch erhöhte tonische GABA-Hemmung im perinfarktalen Kortex gleichzeitig reduziert wird [85].

Darüber hinaus reduziert EE die durch Ischämie induzierte Entzündung durch Herunterregulierung von Apolipoprotein E und IL-1β [86] und verringert die neuronale Apoptose im peri-infarktalen Kortex, was als möglicher struktureller Mechanismus neuroprotektiver Effekte diskutiert wird [87].

2.7. EE als Konzept in der Klinik

Aufgrund der Vielfalt der Wirkungen im Tiermodell liegt es auch im Menschen nahe, zu untersuchen, inwiefern Interventionen mit kognitiver Stimulation und Bewegung über das normale Maß an Zuwendungen (Physiotherapie, Ergotherapie, Logopädie) auf der Stroke Unit hinaus, einen Einfluss auf den klinischen Verlauf nach einem Schlaganfall haben könnte. Hintergrund ist, dass viele Patient:innen nach einem Schlaganfall einen Großteil ihrer Zeit zurückgezogen im Schlafzimmer verbringen – meist allein, isoliert und mit nur geringer körperlicher Aktivität [88]. Dies gilt selbst für spezialisierte Rehabilitationszentren [89]. In der Metaanalyse erstellten Anaker und Kollegen eine zusammenfassende Definition von EE im klinischen Setting. Zum einen umfasst EE die Bereitstellung kognitiv stimulierender Materialien und Geräte wie Bücher, Zeitschriften, Computer oder Spiele. Andererseits stellt die gezielte Förderung der aktiven Teilnahme an unterschiedlichen Aktivitäten einen zentralen Bestandteil EEs dar. Ziel dieser Maßnahmen ist es, die geistige Aktivierung sowie die Selbstbestimmung und Eigenverantwortung der Patient:innen im Rehabilitationsprozess zu fördern, wobei die aktive Beteiligung wesentlich zum Aufbau eines stimulierenden Rehabilitationsumfelds beiträgt [90]. Der Zugang zu anregenden Angeboten wie Lesematerial, Spielen, digitaler Technologie oder Musik kann die Motivation der Patient:innen steigern, aktiv am Rehabilitationsprozess teilzunehmen, und so zur Erhöhung der körperlichen Aktivität beitragen [90–92].

Weitere Studien heben hervor, dass auch die bauliche Gestaltung und Organisation der Schlaganfallstation, insbesondere die Sichtbarkeit und Zugänglichkeit von Gemeinschaftsräumen, einen wesentlichen Einfluss auf die Nutzung von EE-Angeboten

hat. Diese Aspekte sollten daher bei der Planung und Gestaltung der physischen Umgebung berücksichtigt werden [93–97].

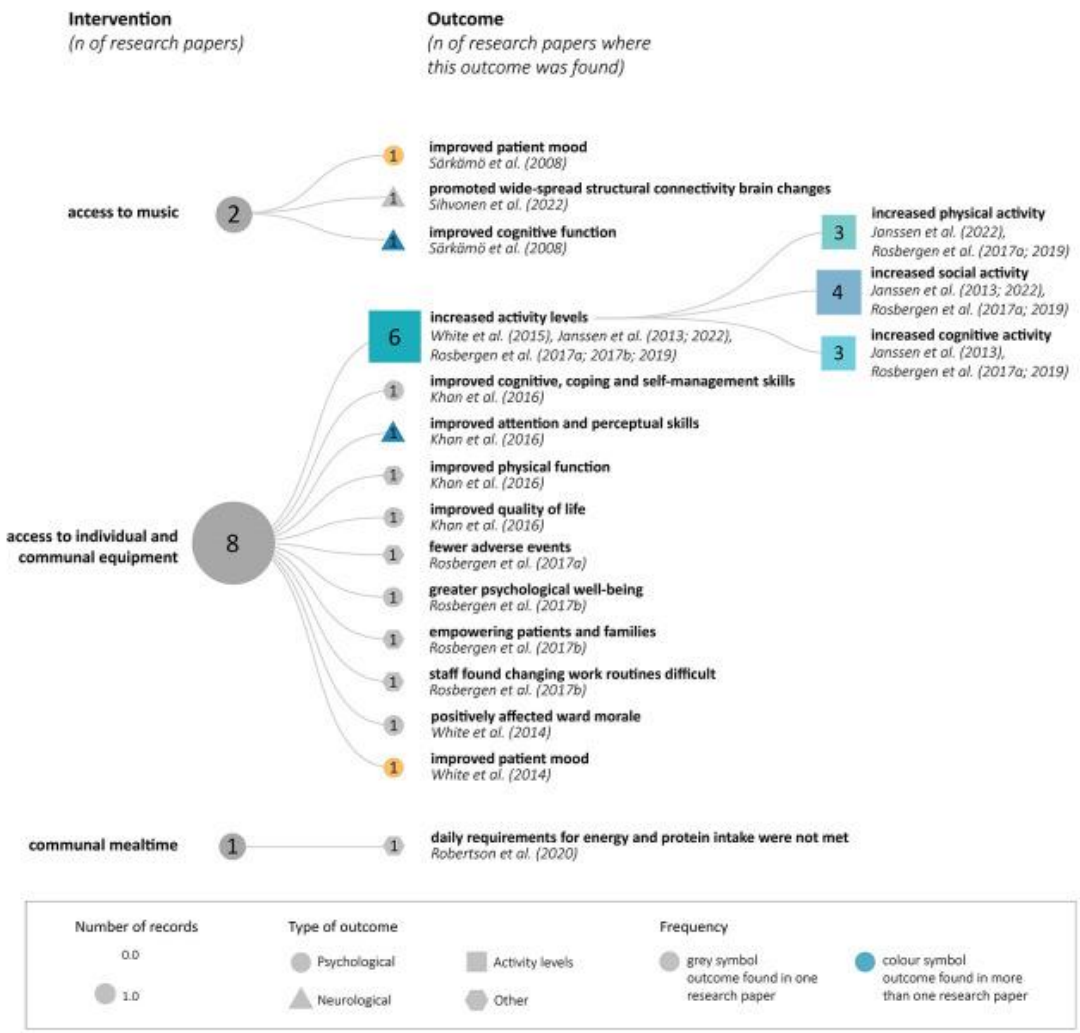


Abb. 4: Übersicht der Interventionen und berichteten Outcomes im Zusammenhang mit Enriched Environments in der Schlaganfallrehabilitation [90] Quelle: Übernommen aus Anåker et al. (2024), HERD, 17(2), 344–359. Lizenz: Creative Commons Attribution 4.0 (CC BY 4.0)

Die Analyse der 11 Studien, die es zu EE im klinischen Setting nach Schlaganfall gab, zeigte, dass sich durch die Intervention die Stimmung, die kognitiven Funktionen, Coping Strategien, Aufmerksamkeit, Lebensqualität und soziale Integration verbesserten [90]. Weitere Studien zu paraklinischen Outcome Parametern (Inflammation, Metabolismus, strukturellen Auswirkungen) wären wichtig, um die guten klinischen Effekte untermauern zu können.

2.8. Genetische und epigenetische Besonderheiten des Kleinhirns und ihre Modulierbarkeit durch Umweltfaktoren

Genetische und epigenetische Besonderheiten des Kleinhirns

Studien zur Ribonukleinsäure (RNA)-Sequenzierung zeigen signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen verschiedenen Hirnregionen [98]. Insbesondere das Kleinhirn weist im Vergleich zu Regionen wie dem Hippocampus unterschiedliche Expressionsmuster von Genen auf, die mit der Molekularphysiologie von Neuronen und Gliazellen assoziiert sind [99]. Eine weitere Studie von Chappell et al. (2018) zeigt, dass sich die Genexpressionsprofile der kortikalen Hirnregionen ähneln, während das Kleinhirn ein deutlich abweichendes Expressionsmuster aufweist. Insbesondere unterscheiden sich dort die Expressionsniveaus einiger mit Alzheimer assoziierter Gene signifikant von denen in anderen Hirnregionen. Dies könnte auf mögliche neuroprotektive Mechanismen im Kleinhirn hindeuten [100].

Auch auf epigenetischer Ebene scheint sich das Kleinhirn von anderem Teil des Gehirns zu unterscheiden. Horvath und Kollegen zeigte 2015, dass das Kleinhirn hinsichtlich der von ihm etablierten “Epigenetischen Uhr” (epigenetic clock) langsamer altert als andere Hirnareale [101]. Als mögliche Gründe wurden ein vergleichsweise reduzierter Metabolismus, geringere Mengen an mitochondrialen (mt) DNA Deletionen und geringerer oxidativer Schäden an mtDNA und nukleärer DNA genannt [102–104].

Einflüsse von EE auf das Kleinhirn

Funktionell sowie strukturell ist das Kleinhirn geprägt von seiner Anpassungsfähigkeit an äußere Einflüsse. EE wirkt sich laut zahlreicher Studien daher besonders günstig auf das Kleinhirn aus. In der Metaanalyse beschreiben Gelfo et al., dass EE im Kleinhirn eine Zunahme der dendritischen Spines und Größe der Purkinjezellen bewirkt [105], was mit einer Stärkung der synaptischen Verbindungen im Kleinhirn und einer verstärkten Feinmodulation von Verbindungen einhergeht [106,107]. Zudem fanden sich in Studien erhöhte Level von BDNF, NGF, Noradrenalin und Chromatin, was auf eine gesteigerte RNA Synthese und Neuroprotektion hindeutet [108–111]. Elektrophysiologisch zeigte sich eine erhöhte neuronale Aktivierung, erkennbar an verkürzten Aktionspotentialen der Körnerzellen sowie höhere Feuerungsfrequenzen, wobei letztere mit der motorischen Leistung korrelierten [112]. In einer Studie von Scholz et al. (2015) zeigte sich im Tiermodell nach Exposition mit EE eine Verringerung des Kleinhirnvolumens, was in in-vivo- und ex-vivo- Magnetresonanztomographie (MRT)-Untersuchungen nachgewiesen wurde. Diese strukturelle Veränderung wurde als Folge von neuronalen Optimierungsprozessen wie das

synaptischem Pruning interpretiert. Funktionell ging dieser Umbau mit einer verbesserten räumlichen Lernleistung einher [113].

2.9. Das Kleinhirn und seine Rolle als Schlüsselakteur in der Rehabilitation nach Schlaganfall. Crossed Cerebellar Diaschisis: Mechanismen und therapeutische Ansätze

Bei einem Schlaganfall kommt es nicht nur zu Einschränkungen des minderperfundierten Areals, sondern auch in davon entfernten, aber verbundenen Arealen, wie zum Beispiel dem Kleinhirn und dem Thalamus. Die Untersuchungen von diesen Ferneffekten von Schlaganfällen beim Menschen sind erst mit der funktionellen Kernspintomographie im breiteren Umfang möglich geworden. Diese pathologische Veränderungen in nicht-ischämischen, entfernten Hirnregionen können akut als Diaschisis auftreten oder zeitversetzt als sekundäre Neurodegeneration (SNDG) und sind anterograd oder retrograd synaptisch zur primären Läsionsstelle verbunden [114].

Bei Großhirninfarkten ist das Kleinhirn ist eine typische Hirnstruktur, die trotz Entfernung vom Schlaganfall Änderungen unterworfen ist. Die "Crossed cerebellar diaschisis" (CCD) beschreibt den Funktionsverlust, den Hypometabolismus und die Perfusionminderung des Kleinhirns infolge einer fokalen Läsion in der kontralateralen Gehirnhälfte. Grundlage ist eine durch die De-Konnektion mit dem Läsionsareal verursachte Minderung der neuronalen Netzwerkaktivität, die als Diaschisis bezeichnet wird [115–118]. Nach einem kortikalen Infarkt korreliert die Ausprägung der CCD mit dem Hypoperfusions-Volumen des Infarktes sowie mit dem neurologischen Schweregrad und dem Grad der Behinderung [119]. In der Konsequenz führt die Deafferenzierung zu einer Beeinträchtigung der Funktion des gegenüberliegenden Kleinhirns. Meist bleibt die CCD jedoch akut symptomfrei. Langfristig kann es jedoch zu einer Wallerschen Degeneration und somit kontralateralen Kleinhirndegeneration mit Atrophie kommen [120].

Die funktionelle Erholung nach einem Schlaganfall hängt mit der Interaktion zwischen dem Motorkortex und dem Kleinhirn, sowie mit der Reorganisation und Wiederherstellung überlebender ipsi- und kontraläsionaler Netzwerke im Gehirn zusammen [121–123]. Eine neue Studie zeigt, dass das Kleinhirn nach einem Schlaganfall durch eine erhöhte Umschaltrate zwischen funktionellen Netzwerken aktiv an der Anpassung und Neuorganisation des Gehirns beteiligt ist [124]. So kann bspw. durch therapeutische Stimulationsverfahren wie der Tiefenhirnstimulation des lateralen Kleinhirnkerns [125] oder die transkranielle Magnetstimulation des Kleinhirns [126] motorische Defizite nach einem Schlaganfall effektiv

verbessert werden. Das CCD-Phänomen ist allerdings noch nicht gut verstanden. Einige Autoren vermuten, dass es ein vorübergehendes Phänomen ist, andere berichten ipsilaterale Ataxie in dem Zusammenhang [119]. Unabhängig von der CCD scheint die "zerebelläre Reserve" ein wichtiger Faktor für die Erholung nach Schlaganfall zu sein. Die oben genannten Auswirkungen von EE auf das Kleinhirn insbesondere tragen dazu bei, dass nach Läsion eine schnellere und bessere Anpassung erfolgen kann.

2.10. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Im Rahmen des vorliegenden Projekts erfolgte eine Untersuchung der Auswirkungen sportlicher Aktivität im Kontext eines "enriched environments" (EE) auf die Funktionserholung nach einem experimentell induzierten Schlaganfall (durch Photothrombose) im Mausmodell. Da diese Arbeit Teil eines größeren Projektes ist, soll hier kurz das Gesamtprojekt beschrieben werden. In der Studie wurde neben der Untersuchung der Einflüsse von EE auch eine Beeinflussung durch die Ernährung im Sinne einer fettreichen Diät (HFD = high fat diet) untersucht. Diese wurde dabei zur Modellierung der Effekte eines metabolischen Syndroms eingesetzt. In diesem Projekt wurden metabolische Untersuchungen (Positronen-Emissions-Tomographie (PET); Insulintoleranztest (ITT); Glukosetoleranztest, (GTT); Computertomographie der Körperzusammensetzung (CT Body Mass)), strukturelle Untersuchungen (immunhistochemische Analysen), molekularbiologische Untersuchungen (Polymerase-Kettenreaktion, PCR und Transkriptomanalyse) und funktionelle Tests (Neuroscore) durchgeführt. Die Hälfte der Tiere verblieben ohne Schlaganfall, bei der anderen Hälfte wurde eine Photothrombose 6 Wochen nach Interventionsbeginn induziert.

In meinem Teilprojekt habe ich mich mit der Gruppe, bei der die Photothrombose induziert wurde, beschäftigt. Ziel war vor allem molekularbiologische Signaturen zu identifizieren, die zu einem guten oder schlechten funktionellen Outcome nach Schlaganfall führen, sowie den Einfluss der EE-Umgebung auf diese zu analysieren. Hierfür erfolgte zunächst die Auswertung der sequentiellen klinischen Untersuchungen nach Schlaganfall sowie eine Transkriptom-Analyse des Cerebellums per RNA-Sequenzierung. Das Kleinhirn war hierfür besonders geeignet, weil es aufgrund seiner strukturellen und funktionellen Plastizität wesentlich an der postischämischen Reorganisation neuronaler Netzwerke beteiligt ist. Wir postulierten demnach, dass EE cerebelläre, plastizitätsfördernde und neuroprotektive Signalwege moduliert und dass sich diese Effekte in Veränderungen des cerebellären Transkriptoms widerspiegelt.

Mithilfe der globalen Transkriptomanalyse sollten Signalwege über einzelne Marker hinaus untersucht und Adaptationsprozesse identifiziert werden.

Ergänzend hierzu und um die distalen Prozesse im Kleinhirn besser einordnen zu können, erfolgten immunohistochemische Färbungen um zusätzlich die lokale Inflammation des Schlaganfalles und deren Auswirkungen auf die Neurone zu analysieren.

Diese Arbeit soll somit zum einen, einen klaren Fokus auf Lebensstilinterventionen setzen, welche ein großes Potenzial als Grundlage für die Rehabilitation nach Schlaganfall bieten können, sowie in der Primärprävention eine größere Rolle spielen sollten, als auch molekulare Mechanismen aufdecken, welche möglicherweise pharmakologisch moduliert werden können.

3. Methoden und Material

3.1. Methoden

Überblick

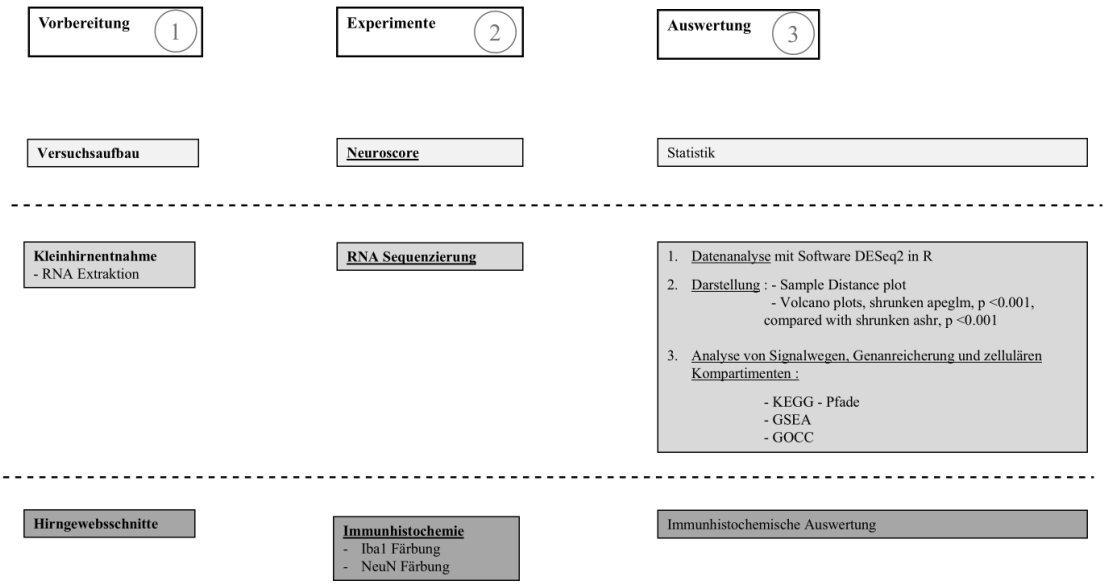


Abb. 5: Übersicht der durchgeführten Experimente: 1) Vorbereitung: Versuchsausfbau, Kleinhirnentnahme, Hirngewebsschnitte 2) Eigene Durchgeführte Experimente: Neuroscore, RNA-Sequenzierung, Immunhistochemie 3) Auswertung: Statistik, DEseq2 in R, Sample distance plot, Volcano plots – shrunken apeglm p<0,001, compared with shrunken ashr, p<0,001, KEGG- pathway, GSEA und GOCC-Analyse

3.1.1. Vorbereitung

3.1.1.1. Versuchsaufbau

Für die Studie wurden erwachsene männliche C57Bl6N-Mäuse im Alter von acht bis zehn Wochen benutzt. Nach einer Eingewöhnungsphase von zwei Wochen in Standardhaltung wurden die Mäuse in vier Gruppen unterteilt:

1) CC NCD: Kontroll-Käfig (CC) + Kontrolldiät (NCD)
2) CC HFD: Kontroll-Käfig (CC) + Hochfett-Diät (HFD)
3) EE NCD: Enriched Environment Käfig (EE) + Kontrolldiät (NCD)
4) EE HFD: Enriched Environment Käfig (EE) + Hochfett-Diät (HFD)

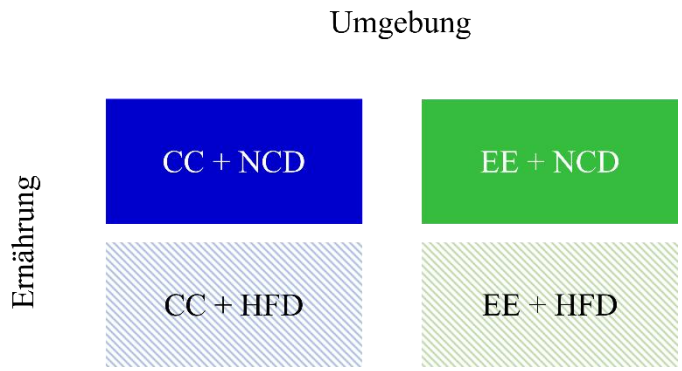


Abb. 6: Gruppeneinteilung: vier Gruppen mit zwei Variablen: Umwelt und Ernährung, CC: untergebracht in Standard-Techniplast-Käfigen, EE: untergebracht in großen Doppeldecker-Käfigen mit zusätzlicher Ausrüstung, die routinemäßig gewechselt wurden. NCD: 13 kJ % Fett; 11 % Saccharose, 3,595 kcal/ kg, HFD: 60 kJ % Fett, 5,150 kcal/kg

Für die EE-Intervention wurden große Doppeldecker-Rattenkäfige (GR1800, Tecniplast, 1862 cm2; OptiRat® Plus 1574 cm2) genutzt. Die Gruppengröße betrug max. zehn Tiere. Die Doppelstock-Käfige wurden mit Stimulationsmaterial ausgestattet, die dreimal pro Woche umgestellt und gewechselt wurden. Zur Ausstattung gehörten Laufräder, Iglus, Tunnel, Häuser, eine Mezzanine, Holzklötze, Nistmaterial (Bio Services BV, 5500 AA Uden, Niederlande), eine Leiter zum Besteigen des Oberdecks (vgl. Abb. 7A). Die Kontrolltiere waren in Standardkäfigen (control caging, CC) mit bis zu fünf Tiere untergebracht und nur mit einem Nestlet von 40x40 mm und Streu ausgestattet (Abb. 7B).

Zusätzlich wurden die Tiere aus den EE- und CC-Gruppen in zwei Diät-Gruppen unterteilt und entweder einer normalen Ernährung (NCD, 13 kJ % Fett; 11 % Saccharose, 3,595 kcal/kg, E 15748-04) und einer fettreichen Diät (HFD, 60 kJ % Fett, 5,150 kcal/kg) zugeteilt. Die NCD-Diät zeichnete sich durch einen niedrigen Gehalt an gesättigten Fettsäuren und Saccharose sowie einen hohen Gehalt an Ballaststoffen aus und entsprach somit einer physiologisch gesunden Mausdiät. HFD war durch einen hohen Fettgehalt gekennzeichnet und wurde verwendet, um das metabolische Syndrom, Fettleibigkeit und Glukoseintoleranz bei Mäusen zu induzieren. Alle Mäuse hatten dauerhaft uneingeschränkten Zugang zu dem jeweiligen Futter und Wasser. Im Rahmen des Experiments wurden alle Mäuse einem 12-h-Licht- und 12-h-Dunkelphasenzyklus ausgesetzt, welcher über den gesamten Versuchszeitraum unverändert blieb. Die Betreuung der Versuchstiere sowie die Organisation der Käfige erfolgte durch Cl. Orschel, A. Ladwig und Ch. Orschel.

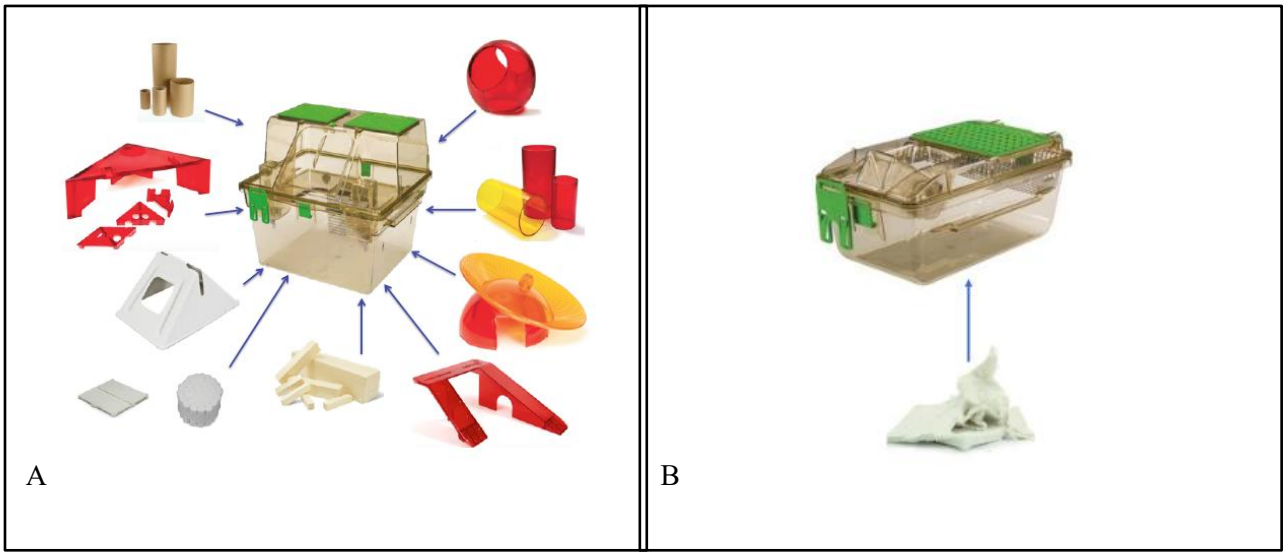


Abb. 7: Versuchsaufbau (A) Doppelstockkäfig mit Stimulationsgeräten und (B) Standardkäfig mit Bettzeug

Nach einer sechswöchigen Interventionsphase wurde durch A. Ladwig unter Isofluran-/Lachgas-Narkose mit präoperativer Analgesie eine kortikale Photothrombose mittels Bengalrosa-Injektion und gezielter Schädelbeleuchtung zur Induktion eines kortikalen Schlaganfalls durchgeführt. Mäuse wurden während des gesamten Experiments in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut (MPI) für Stoffwechselforschung mehreren [18F] Fluordesoxyglukose (FDG) -Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Messungen unterzogen. Die PET-Bildgebung wurde vor Beginn der Intervention (PET 0), ein Tag nach Beginn (PET 1), sechs Wochen nach Intervention (PET 2) sowie ein Tag nach PT (PET 3) und 14 Tage nach PT (PET 4) durchgeführt. Intervention Die PET-Messungen wurden von H. Backes und A. L. Cremer durchgeführt. Zusätzlich wurden eine Woche vor und nach PT GTT und ITT durchgeführt (A. Ladwig, Ch. Orschel, Cl. Orschel). Zur Messung der Infarktgröße wurden am Tag 2 nach PT T2-gewichtete MRT-Bilder angefertigt. Die MRT-Scans wurden von D. Wiedermann, U. Uhlenkueken, S. Blaschke, S. Vlachakis, A. Ladwig durchgeführt. Zur funktionellen neurologischen Beurteilung nach Schlaganfall wurden serielle Neuroscore - Untersuchungen inkl. Grid-Walk-Tests und ein Open-Field-Test durchgeführt und das Gewicht wurde täglich gemessen (Durchführung: A. Ladwig, Beurteilung: V. Zimmermann). Am Tag 16 nach Schlaganfall wurden die Tiere getötet. Ein Teil der Tiere wurde perfundiert. Diese Gehirne wurden geschnitten (A. Ladwig, Ch. Orschel, Cl. Orschel, Cl .Drapatz) und für Immunohistochemie (A. Ladwig, Ch. Orschel, Cl. Orschel, J.Romer, V. Zimmermann) genutzt. Der andere Teil der Tiere wurde dekapitiert und die Gehirne wurden bei -80°C eingefroren, um später für die RNA-Sequenzierung und

PcR Analyse aufbereitet zu werden (A. Ladwig, J. Romer, V. Zimmermann). Die Gesamtzeit unter experimentellen Bedingungen betrug acht Wochen und zwei Tage. Die RNA wurde mit dem Illumina-System sequenziert, das Transkriptom wurde sequenziert und einer bioinformatischen Analyse unterzogen (U.Goebels, CECAD). Das Sequencing erfolgt in der Core-Facility Zentrum für Molekulare Medizin **(**ZMMK) der Universität zu Köln. Des Weiteren wurden Gen-Set-Enrichment-Analysen (GSEA) sowie Gen-Ontologie-Überrepräsentationsanalysen (GOCC) der Transkriptomdaten durchgeführt (A. Ladwig, V. Zimmermann).

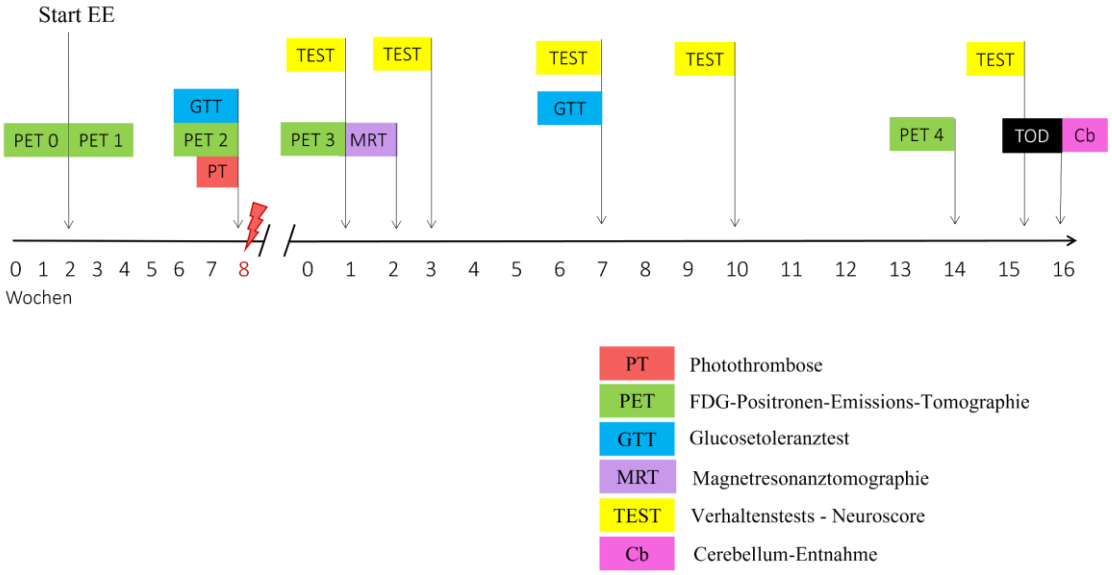


Abb. 8: Versuchsplan: zwei Wochen Eingewöhnungszeit, PET0: eine Woche vor Beginn der Intervention, PET1: ein Tag nach Beginn, PET2: sechs Wochen nach Beginn, PET3: ein Tag nach PT, PET4: 14 Tage nach PT; MRT: zwei Tage nach PT; GTT eine Woche vor und nach PT, Verhaltenstests folgten nach PT an den Tagen 1, 3, 7, 10 und 16 (Grid-Walk-Training vor PT), MRT: Magnetresonanztomographie, PET: Positronen-Emissions-Tomoraphie, PT: Photothrombose, GTT: Glucosetoleranztest

3.1.1.2. Gewebeentnahme

Die Tiere wurden unter Inhalation von Isofluran narkotisiert. Nach Eintritt einer ausreichend tiefen Narkose wurden die Hälfte der Tiere dekapitiert, woraufhin Leber und Gehirn entnommen, das Kleinhirn, sowie weitere Areale (kortikal und subkortikal) separiert und unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Bei der anderen Hälfte der Tiere wurde vor der Dekapitation eine Perfusion mit Formaldehyd durchgeführt. Anschließend wurden die Gehirne entnommen, bei - 80°C eingefroren und für die immunhistochemische

Analyse weiterverarbeitet. Hierzu wurden koronare Hirnschnitte mit einer Dicke von 10 µm mithilfe eines Leica-CM3050-S-Kryostaten angefertigt. Die Präparate wurden anschließend bei −80 °C auf Objektträgern gelagert.

3.1.2. Eigene experimentelle Untersuchungen

3.1.2.1. Funktionelle Testung mittels Neuroscore

Nach der Photothrombose wurden Funktionstests durchgeführt, um die funktionelle Einschränkung, aber auch die Regeneration der Mäuse nach Schlaganfallinduktion beurteilen zu können. Hierbei wurde an Tag 1., 3., 7., 10. und 16. nach der PT ein Neuroscore ermittelt, der sich aus der Beurteilung des allgemeinen Erscheinungsbildes, einem neurologischen Test (Sensomotor Score) und einem Gitter-Lauftest (Grid Walk Test) zusammensetzte, der zuvor in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und an das Experiment angepasst wurde (Abb. 9) [127]. Der Score kombinierte ein in unserer Arbeitsgruppe bereits verwendetes Bewertungssystem [127] mit einem am Max-Planck-Institut (MPI) etablierten System [128].

Der Neuroscore wurde standardisiert gefilmt. Die Auswertung erfolgte im Anschluss verblindet und nach dem unten dargestellten Punktesystem (Abb. 10).

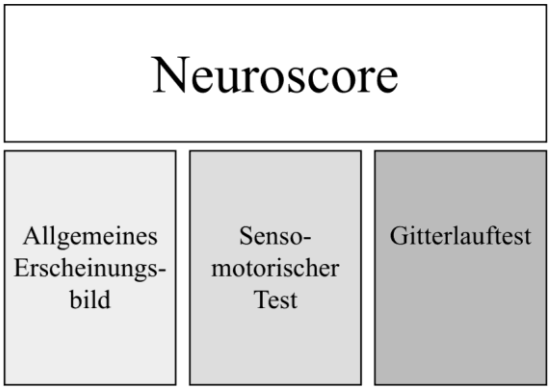


Abb. 9: Neuroscore umfasst allgemeines Erscheinungsbild, Sensomotorischer Test und Gitterlauftest (nach Walter et al. 2015).

Die sensomotorischen Tests bewerteten die Bewegungsfähigkeit der Vorder- und Hinterpfoten. Dabei lag der Fokus auf der Untersuchung der linken Körperhälfte der Tiere, da der Infarkt in der rechten kortikalen Hirnregion lokalisiert war. Die Testung erfolgte in fünf Abschnitten: 1) Im ersten Abschnitt wurde der allgemeine Zustand bewertet, wie sich

die Maus auf freier Fläche bewegt und wie der Zustand ihres Fells ist. Ein ungepflegtes Erscheinungsbild erhielt 0 Punkte (P), während ein sauberes, gepflegtes Fell einen Punkt bekam. 2) Im nächsten Abschnitt wurde bei Fixierung am Schwanz in hängender Position die Kopfhaltung sowie die Beweglichkeit der linken Vorder- und Hinterpfoten im Vergleich zur rechten Seite beurteilt. Eine Kopfhaltung von über 10° wurde mit einem Punkt bewertet. Die Beweglichkeit jeder Pfote wurde mit 0 bis 4 Punkten bewertet, wobei vier Punkte einer uneingeschränkten/normalen Bewegung entsprachen. 3) Die weitere Testung erfolgte unter Fixierung am Nacken und am Schwanz. Dabei wurde das Tier langsam an eine Kante herangeführt, bis die Pfoten der linken Seite keinen Halt mehr haben und abrutschen. Es wurde die Reaktion und das Wiederhochführen der linken Pfoten beurteilt und anhand einer Punkteskala von 0 bis 5 bewertet. Die maximale Punktzahl von 5 Punkten wurde vergeben, wenn die Pfote nach dem Herabrutschen von der Kante diese wieder optimal erreichte. 4) Zur Testung des Whisker-Reflexes wurde die Maus langsam am Nackenfell und Schwanz fixiert an eine Wand herangeführt. Wendete sich die Maus bei der Berührung zur getesteten Seite, war der Test positiv und es wurden zwei Punkte vergeben. 5) Zusätzlich wurde der Gitterlauftest (Grid-Walk-Test) durchgeführt, um die motorische Funktionsfähigkeit, das Gleichgewicht und sekundär sensorische Defizite zu erfassen. Voraussetzung für den Gitterlauftest war, dass alle Mäuse diesen 3 Tage vor der PT geübt hatten und vor der PT fehlerfrei auf dem Gitter laufen konnten. Dadurch wurden gleiche Bedingungen geschaffen. Der Grid-Walk-Score wurde in einen quantitativen Score (Anzahl der Fehler = Tritte durch das Gitter, max. 6) und einen qualitativen Score (für die Art und Weise, wie das Gitter erklommen wurde) unterteilt.

Die erreichten Score-Punkte wurden schließlich zu einem Gesamtscore von maximal 30 Punkten addiert. Niedrigere Werte entsprachen einer starken Beeinträchtigung.

Neuroscore	0	1	2	3	4	5	6
Allgemeines Erscheinungsbild	ungepflegt	Sauberes Fell					
Kopfneigung nach oben <10°	Nein	Ja					
Bewegung Linke Vorderpfote (0-4P)	Pfote bewegt sich gar nicht, hängend, wird fixiert am Körper gehalten	eingeschränkte Bewegung, Pfote wird überwiegend am Körper gehalten	eingeschränkte Bewegung, Pfote bewegt sich auf und ab, aber asymmetrisch im Vergleich zur Gegenseite	geringe Asymmetrie der Pfoten-bewegungen bei normalem Bewegungs-ausmaß	normal		
Bewegung Linke Hinterpfote (0-4P)							
Linke Vorderpfoteplatzierung (0-5P)	Pfote hängt paretisch herab, keinerlei Bewegung	Pfote hängt überwiegend herab, aber wird etwas in der Horizontalebene über dem Tisch bewegt	Pfote hängt überwiegend herab, aber wird sowohl in der Horizontalebene als auch in der Vertikalebene über dem Tisch bewegt, Pfote bewegt sich leicht nach oben	Pfote hängt meist herab, wird aber mäßig sowohl in der Horizontalebene als auch in der Vertikalebene bewegt, Pfote bewegt sich aber erreicht die Kante nicht	Pfote hängt nur leicht herab, wird deutlich sowohl in der Horizontalebene als auch in der Vertikalebene bewegt, schafft es meistens nach oben	normal	
Linke Hinterpfotenplatzierung (0-5P)							
Whisker Reflex (0-2P)	Nicht Vorhanden		Vorhanden				
Grid walk/Gitterweg	> 6 Fehler	5 Fehler	4 Fehler	3 Fehler	2 Fehler	1 Fehler	0 Fehler
Grid walk Qualität	Lange Pause, bleibt stehen oder geht gar nicht hoch, Orientierung fehlt	sehr langsame und vorsichtige Fortbewegung	Bewegt sich qualitativ gleichmäßig nach oben				

Abb. 10: Neuroscore, Punkte 0-6 P.

3.1.2.2. Immunhistochemische Färbung

Es wurden Gehirnschnitte mit den Hirnregionen Striatum, der Bereich mit dem größten Infarktbereich, Hippocampus und Thalamus ausgewählt. Hierbei wurden im ersten Schritt primäre Antikörper gegen die Zielantigene verwendet (Iba1, NeuN) und in einem zweiten Schritt mit einem geeigneten sekundären Antikörper gekoppelt, welcher eine fluoreszierende Komponente gebunden hatte (goat-anti-rabbit 568). Die Zellkerne wurden mittels Hoechst-Färbung dargestellt.

Am ersten Tag wurden die für die immunhistochemische Färbung vorgesehenen Präparate zunächst aus dem Gefrierschrank (-80ºC) entnommen und für einen Zeitraum von zehn Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Zunächst wurden die auf den Objektträgern befindliche Schnitte mit einem Fixationsstift bzw. Histofix umrandet und für die Dauer einer Stunde mit je 300 µl einer 4% PFA pro Schnitt in einer Feuchtkammer bei einem pH-Wert von 7,0 und Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurden die Präparate fünf Minuten in einem Gefäß mit einer einprozentigen phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gestellt und dadurch gewaschen. Nachfolgend wurden die Präparate für zwanzig Minuten im Citratpuffer bei einer Temperatur von 80°C inkubiert. Anschließend wurden die Präparate erneut für fünf Minuten mit PBS gewaschen und eine sogenannten Blocklösung aus

fünfprozentigem Ziegenserum (Normal Goat Serum, NGS) in 1% PBS und 0,3 % Triton X-100 hergestellt. Nachfolgend wurde jeweils 300 µl der Lösung pro Schnitt bei Raumtemperatur auf die Präparate aufgetragen. Die Blockerlösung diente dazu, unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern. In Kombination mit der Gabe von 0,3 Prozent Triton X-100 (in einprozentigem PBS) wurden die Zellmembranen für die Antikörper durchlässig. Nach Inkubation und Entfernung der Blockerlösung wurde der Primärantikörper (Iba1 oder NeuN, siehe Tbl. 4) in einer Verdünnung von 1:500 in einprozentigen NGS und einprozentigen PBS in 0,3 % Tx-100 Lösung auf die Schnitte gegeben und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde der primäre Antikörper entfernt und die Proben fünf Minuten lang mit PBS gewaschen. Vor der Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Maus-AK) wurde die Sekundärantikörperlösung im Verhältnis 1:500 in einem prozentigem NGS und in 0,3 % Tx-100 gemischt. Anschließend wurden 300 µl der Lösung auf die Schnitte aufgetragen und für einen Zeitraum von einer Stunde inkubiert. Der Sekundärantikörper war gegen Kaninchen-IgG gerichtet.

Die Präparate wurden erneut mit einprozentigem PBS gewaschen und anschließend 5 Minuten lang mit Hoechst (1:500 in PBS verdünnt) inkubiert. Die Färbung mit Hoechst diente der Sichtbarmachung der Zellkerne. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen.

Zum Schluss wurden die Objektträger mit den gefärbten histologischen Schnitten für die Fluoreszenzmikroskopie mit Fluoromount G und Deckgläschen eingedeckelt. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei 4 °C. Im Anschluss wurde die Fluoreszenz unter dem Mikroskop analysiert (siehe Tbl. 4).

3.1.2.3. RNA-Extraktion

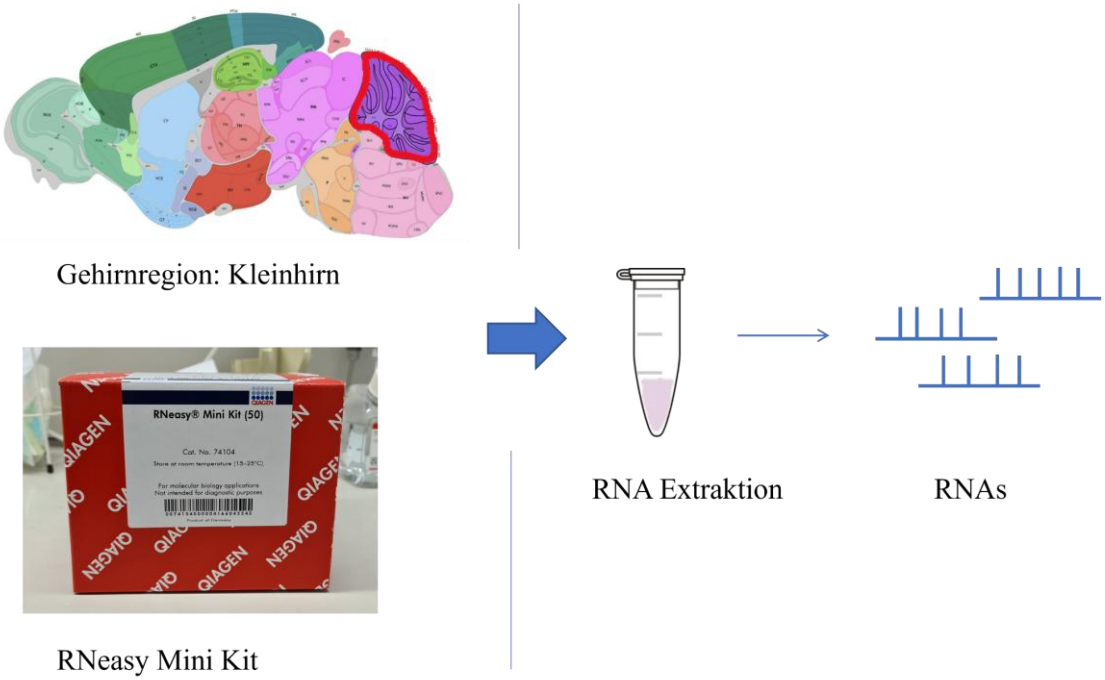


Abb. 11: Darstellung Kleinhirnentnahme: Abbildung angepasst nach: © 2011 Allen Institute for Brain Science. Allen Human Brain Atlas. Online verfügbar unter: mouse.brain-map.org und Trizol RNA-Extraction Kits (invitrogen) in Kombination mit RNAeasy Qiagen

Die Gesamt-RNA aus dem Kleinhirn wurde unter der Verwendung des Trizol RNA-Extraction Kits (Invitrogen) in Kombination mit RNAeasy Qiagen gemäß den Herstellerangaben extrahiert (vgl. Abb. 11). Zu Beginn wurden die bei -80 Grad gelagerten Kleinhirngewebe zur auf Eis vorsichtig aufgetaut. Mit einer Rasierklinge wurde jeweils das Kleinhirn koronar geteilt, sodass zwei Proben entstanden, die Kleinhirngewebe der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphären enthielt. Die Proben wurden jeweils zur RNA (und die andere zur Proteinextraktion genutzt). Die Probe wurde in ein 2-ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Dann wurde 1ml Trizol, eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, hinzugefügt, wodurch eine Lysierung des Gewebes initiiert wurde. Zur besseren Homogenisierung wurde die Gewebeprobe mit einem Gewebemixer zerkleinert. Zwischen den einzelnen Proben wurde der Mixer in einer alkoholischen Lösung gesäubert. Nach der Homogenisierung der Proben wurde 200 µl Chloroform (CHCL3) unter dem Abzug hinzugegeben und daraufhin 15 Sekunden gevortext. Nach einer Ruhezeit von fünf Minuten und einer anschließenden Zentrifugation über zehn Minuten bei 12.200 Umdrehungen pro Minute und 4 °C erfolgte eine Trennung des Homogenats/Lysats in drei Phasen: Es entstand eine obere, klare, flüssige bzw. wässrige Phase, die die RNA enthielt.

Von dieser Lösung wurden 400 µl in ein neues Tube überführt. Zusätzlich bildete sich eine Grenzschicht sowie eine untere, organische Schicht, die die DNA und Proteine enthielt. Zu der RNA-haltigen Phase wurden direkt 400 µl Ethanol (70 Prozent in RNAse- freiem Wasser) dazugegeben und durch Auf- und Abpipettieren mit der wässrigen Phase vermischt, um die RNA aus der umgebenden Lösung auszufällen. Jeweils 700 µl dieser Lösung (des Tubes) wurde dann auf je eine 2 ml RNeasy Mini Spin Säule übertragen und 15 Sekunden lang bei 8000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Dabei blieb die RNA an der Silicamembran der Säule haften. Die flüssige Phase, die sich in dem Tube nach der Zentrifugierung unterhalb der Membran befand, wurde verworfen. Es wurde je 700 µl RW1-Puffer hinzugefügt und es wurde15 Sekunden bei 8000 Umdrehungen pro Minute erneut zentrifugiert, wodurch die Membran gewaschen wurden. Darauf wurde die flüssige Phase ein weiteres Mal verworfen. Zur Lösung der RNA aus der Membran wurde 500 µl RPE-Puffer jeweils einem Tube hinzugefügt und es folgte eine weitere Zentrifugierung bei 8000 Umdrehungen pro Minute (zunächst 15 Sekunden, dann zwei Minuten lang). Der letzte Schritt wurde noch einmal wiederholt. Die auf der Membran der Säulen haftende RNA wurde in ein 1,5 ml großes Tube überführt und 30 µl RNAse-freiem Wasser wurde beigemischt. Anschließend wurde eine Minute bei 8000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der letzte Schritt ein weiteres Mal wiederholt. Schließlich wurden die Tubes mit RNA-Lösungen erstellt, in denen die RNA der Kleinhirnzellen in RNA-freiem Wasser unterhalb der Membran gelöst vorlag. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Im Rahmen der weiteren Versuche wurden die Konzentrationen der RNA mittels Spektralphotometer (NanoDrop™) gemessen. Danach wurden die RNA-Lösungen bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.1.2.3.1. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Nukleinsäuren-Konzentrationen der einzelnen RNA-Proben wurde mithilfe des Spektrophotometers Nanodrop (™) bestimmt, um die Reinheit der Proben zu überprüfen. Die Messung diente zudem dazu, lagerungsbedingte Veränderungen zu identifizieren und die Messgenauigkeit zu erhöhen. Im Rahmen dieser Untersuchung erfolgte die Applikation von 1 µl einer RNA-Lösung direkt auf die Detektionsfläche. Für die Konzentrationsbestimmung wurden lediglich geringe Probenmengen benötigt. Anschließend wurden alle Proben auf eine einheitliche Konzentration von 5 ng/µl verdünnt, sodass alle Proben die gleiche Gesamtkonzentration an RNA aufwiesen.

3.1.3. Auswertung

3.1.3.1. Bildgebung und Bearbeitung

Repräsentative Bilder wurden unter Verwendung des Fluoreszenzphasenkontrastmikroskops (Keyence BZ-9000E, Osaka, Japan) mit 10x-, und 20x-Objektiven aufgenommen. Für die Ganzhirnanalyse und das Brain-Mapping wurden mit dem 10x- Objektiven komplette Scans aufgenommen. Für eine detaillierte Analyse wurden mit den 20x- Objektiven Bilder von verschiedenen Bereichen einschließlich Infarktgewebe, Periinfarktgewebe und ipsi- und kontralateralem Kortex aufgenommen.

3.1.3.2. mRNASeq mittels Illumina

Die Probenaufbereitung und die mRNA-Sequenzierung wurden gemäß einem standardisierten Protokoll der Genomics Core Facility des ZMMK der Universität zu Köln unter Verwendung des Illumina® Stranded TruSeq® RNA Sample Preparation Kits durchgeführt. Die mRNA-Sequenzierung wurde mit dem Illumina® Stranded TruSeq® RNA Sample Preparation Kit durchgeführt. Die Bibliotheksvorbereitung basierte auf 500 ng Gesamt-RNA. Nach der Poly-A-Selektion mittels Poly-T-Oligo-gebundener Magnetkügelchen wurde die mRNA fragmentiert und rücktranskribiert. Die zweite Strang-Synthese der cDNA erfolgte mit DNA-Polymerase I und RNase H. Anschließend wurden die Enden repariert, ein A-Tailing durchgeführt und Indexadapter ligiert. Nach Reinigung und Amplifikation (15 PCR-Zyklen) wurden die cDNA-Bibliotheken validiert (Agilent TapeStation), quantifiziert (Peqlab KAPA Kit, Applied Biosystems 7900HT) und gepoolt. Anschließend wurden sie auf einem Illumina NovaSeq 6000 im PE100-Modus sequenziert.

Es wurden insgesamt 20 Proben sequenziert, jeweils 5 Proben pro Gruppe.

3.1.3.3. Statistik-Neuroscore

Die statistische Analyse wurde unter Verwendung des Programms GraphPad Prism Version 9.3.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Zur Analyse der Daten wurden je nach Verteilung und Struktur der Daten verschiedene statistische Tests verwendet.

Um Unterschiede zwischen den vier Gruppen zu ermitteln, wurden zunächst bei mindestens intervallskalierten, normalverteilten Daten einfaktorielle Anovas durchgeführt. Als post-hoc Test wurde der Tukey-Test verwendet. Bei ordinalskalierten oder nicht normal

verteilten intervallskalierten Daten wurden Kruskal-Wallis Tests durchgeführt, um die Unterschiede zwischen den Gruppen zu analysieren (Post-hoc-Tests nach Dunn bei signifikanten Ergebnissen). Alle Datensätze wurden mit dem Anderson-Darling-Test und dem D'Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung getestet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert des Scores ± Standardfehler (SEM) dargestellt, wobei ein p-Wert von <0,05 als statistisch signifikant galt. Die Signifikanzgrade wurden in den Abbildungen und Tabellen wie folgt gekennzeichnet: ** p < 0.05 (signifikant) ** p < 0.01 hoch signifikant), *** p < 0.001 (sehr hoch signifikant) **** p < 0.0001, ns (nicht signfinikant).* Die Daten wurden grafisch als Box-and Whisker Plots nach Tukey dargestellt. Um den Einfluss der jeweiligen Faktoren EE, Diät und gemischte Effekte (EE*Diät) zu ermitteln, wurden 2-faktorielle ANOVAs sowie multiple lineare Regressionsanalysen für die Tage 1, 3, 7, und 16 nach PT durchgeführt.

Die Effekte von Sport, Ernährung und Zeit auf die abhängigen Variablen wurden mittels einer dreifaktoriellen Varianzanalyse analysiert, um die Interaktionen dieser Faktoren zu erfassen. Die hier beschriebene Methode erlaubte die Untersuchung der Haupteffekte jedes einzelnen Faktors sowie deren Interaktionseffekte.

3.1.3.3.1. Shrinkage Methoden der DESeq2 Daten in R

Zur Analyse der Sequenzierungsdaten wurden durch die IT des CECAD (U. Goebels) zwei unterschiedliche Shrinkage-Methoden angewendet. Dadurch sollten übergroße log2-fold-change Werte vermieden und stabilere Ergebnisse erzielt werden, insbesondere bei Genen mit geringen Stichprobengrößen, wie sie in unserem Experiment vorlagen: 1) aepglm: Die erste Methode apeglm und steht für “Approximate Posterior Estimation for generalized linear model (GLM) coefficients” [129]. Die Methode rechnete empirische Bayes Shrinkage (Schrumpfungsschätzer) für Effektgrößen für eine Vielzahl von GLM-Modellen. Diese Vorgehensweise stellte eine gängige Methode zur Auswertung von DeSeq2-Daten dar, um starke Variation in den log2-fold-Veränderungen zu vermeiden und eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu schaffen. 2) ashr: steht für “Adaptive Shrinkage for High-dimensional data”. Die Anwendung von ashr ermöglichte eine bessere Ausgleichung von Varianzen innerhalb der Gruppen. Die Umsetzung der genannten Methoden erfolgte unter Verwendung der DESeq2 mit R.

3.1.3.3.2. Principal Component Analysis und Sample Distance Plot

Als nächster Schritt erfolgte eine Principal Component Analysis, um Outlier zu identifizieren. Auch der Sample Distance Plot diente der Veranschaulichung der Unterschiede in der Gen-Expression zwischen den Proben, um eventuelle Ausreißer oder fehlerhafte Proben zu identifizieren. Der Sample Distance plot visualisierte die Distanzen zwischen den Proben in Form einer Heatmap. Die x-Achse sowie die y-Achse repräsentierten jeweils die verschiedenen Proben. Die Farbcodierung der Felder der Heatmap entsprach dem Abstand zwischen den jeweiligen Proben. Dabei standen dunklere Blautöne für geringere Werte/geringe Distanzen, was auf eine hohe Ähnlichkeit der Proben in Bezug auf die gemessenen Merkmale hindeutete. Hellere Farbtöne hingegen repräsentierten höhere Werte/größere Distanzen zwischen den Proben.

19 RNA-Proben wurden analysiert, davon vier aus der CC-NCD-Gruppe sowie jeweils fünf aus den Gruppen CC-HFD, EE-NCD und EE-HFD Gruppe.

3.1.3.3.3. Volcano Plots

Volcano Plots wurden zur grafischen Darstellung der am stärksten veränderte Gene zwischen den einzelnen Interventionsgruppen verwendet. Es wurden hierbei zur Analyse die oben genannten statistischen Methoden „apeglm“ und „ashr“ sowie die Vergleichsvarianten „normal“ und „inverted“ verwendet. Die Volcano Plots wurden mithilfe der Software R, des DESeq2-Pakets für die statistische Analyse und des ggplot2-Pakets für die grafische Darstellung erstellt. Auf der x-Achse wurde der Log-Fold-Change (log_2FC) aufgetragen, wobei positive Werte eine Hochregulation und negative Werte eine Herunterregulation der Gene anzeigten. Auf der y-Achse wurde der negative Logarithmus des P-Werts dargestellt, sodass höher gelegene Punkte statistisch signifikanten Unterschieden in der Genexpression entsprachen. Dabei wurde statistisch für die Menge an Tests korrigiert. Die auf dem Plot dargestellten Punkte repräsentierten jeweils ein Gen. Signifikant veränderte Gene wurden durch folgende Farbcodierungen hervorgehoben. Gene, die signifikant hoch- oder herunterreguliert waren (p-Wert < 0,05) und einen logFC von > 0,5 und < -0,5 hatten, wurden in Rot dargestellt. Gene, die nicht signifikant verändert waren (p-Wert ≥ 0,05), aber einen logFC von >0,5 hatten, erschienen in Grün. Die Farbe Blau wurde für Gene verwendet, die p-Werte von <0,001 aufwiesen, unabhängig vom log FC.

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf den Effekt von Sport gelegt, weshalb die Gene aus den Vergleichen EE NCD vs. CC NCD sowie EE HFD vs. CC HFD ausgewählt wurden. Die

Auswahl der Gene erfolgte anhand der Volcano-Plots der Gruppenvergleiche, bei denen zwei Kriterien berücksichtigt wurden: Einerseits Gene mit einem p-Wert cut off < 0,001 und log2FC > 0,5 bzw. < −0,5, als auch Gene die unabhängig des log2FC einen adjustierten p-Wert von <0,05 erreichten. Trotz geringer Expressionsänderung waren sie hoch signifikant reguliert. Gene mit einem nicht signifikanten logFC ≤ 0,5 und einem p-Wert ≥ 0,05 wurden nicht berücksichtigt.

3.1.3.3.4. KEGG-pathway- und GSEA-Analyse

Um eine ganzheitliche Sicht auf Genomdaten zu erlangen, wurden die signifikant veränderten Gene auch im Kontext von Stoffwechselpfaden und biologischen Systemen analysiert. Dies erfolgte zum einen mittels KEGG Analyse (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [130]. Die Zuordnung zu KEGG-Pfaden ermöglichte die Untersuchung der biologischen Funktionen und Signalwege. Die identifizierten Signalwege waren durch spezifische Identifikationsnummern (IDs) gekennzeichnet. In verschiedenen Schaubildern der Signalwege wurden die jeweiligen Gene durch kleine Kästchen dargestellt. Hochregulierte Gene wurden in Rot hervorgehoben, während herunterregulierte Gene in Blau dargestellt wurden. Für diese Untersuchung wurden die Signalwege/ KEGG Pathways herausgesucht, in denen sich die meisten signifikant veränderten Gene befanden.

Darüber hinaus wurde die GSEA-Methode angewendet. Auf diese Weise war es möglich, systematisch zu identifizieren, ob vordefinierte Gruppen von Genen (sogenannte Gene-Sets), die mit biologischen Prozessen, Signalwegen oder bestimmten Zellfunktionen assoziiert sind, in den vorliegenden Bedingungen, beispielsweise EE vs. kein EE, angereichert waren [131]. Zur visuellen Darstellung wurde zum einen die Methode der 1) Enrichment-Plots verwendet. Die x-Achse stellte dabei alle Gene dar. Die y-Achse zeigte den Enrichment Score (ES), welcher durch die grüne Linie repräsentiert wurde. Der Graph zeigte einen Anstieg der Kurve bei einem positiven Enrichment-Score, der eine hohe Anreicherung der Gene des betrachteten Gene-Sets widerspiegelte. Bei einem negativen Enrichment-Score, der eine geringe Anreicherung der Gene des Gene-Sets in den niedrig regulierten Bereichen indizierte, war ein negativer Enrichment-Score zu beobachten. Unter der x-Achse wurden Balken angezeigt, die die Dichte der Balken an einem Ende der x-Achse repräsentierten und somit auf eine Anreicherung des Gene-Sets in dieser Region hinwies.

Zur Interpretation der GSEA-Ergebnisse wurde ein weiteres Diagramm erstellt, welches die Normalized Enrichment Score (NES)-Werte im Kontext der Signifikanz veranschaulichte. Der NES diente dem Vergleich der Enrichment Scores verschiedener Gene-Sets, wobei die

jeweilige Größe der Sets keine Rolle spielte. Die grafische Darstellung erfolgte anhand zweier Achsen. Die x-Achse zeigte den NES, während die y-Achse die Signifikanz widerspiegelte, die durch einen p-Wert oder einen q-Wert dargestellt werden konnte. Die jeweiligen Werte wurden durch rote Punkte für den False Discovery Rate (FDR)-q-Wert und schwarze Punkte für den p-Wert repräsentiert. Jedes Gene-Set wurde als Punkt dargestellt. Ein höherer NES indizierte eine verstärkte Anreicherung eines Gene-Sets. Ein p-Wert von unter 0,05 indizierte, dass die beobachtete Anreicherung nicht zufällig, sondern statistisch signifikant war. Dies wurde im Diagramm durch eine Linie dargestellt, die alle Werte unterhalb eines Schwellenwertes von 0,05 mit einer gelben Fläche kennzeichnete. Gene-Sets mit hohen NES-Werten und niedrigen p-Werten/FDR-Werten wurden als signifikant betrachtet und befanden sich im unteren rechten Bereich des Diagramms.

Des Weiteren wurden die Ergebnisse der GSEA in Form einer Heatmap präsentiert. Die Farbgebung der Heatmap entsprach dabei der Expressionstärke der Gene in den jeweiligen Proben. Dabei stand die Farbe Rot für eine hohe und Blau für eine niedrige Expressionstärke. Die Gene innerhalb eines bestimmten Gene-Sets wurden auf der y-Achse aufgelistet, während die Proben auf der x-Achse dargestellt wurden.

3.1.3.3.5. GOCC-Gene Ontology Cellular Component Analyse

In der Folge wurde eine GOCC-Analyse durchgeführt, um die zellulären Funktionen von den Genen zu analysieren [132]. Dabei wurden Grafiken erstellt, die den Genen spezifische Zellkomponenten zuordneten. Die Analyse basierte auf der Gene Ontology (GO) Datenbank, welche Informationen über die biologischen Funktionen der Gene bereitstellte. Die Netzwerk-GOCC-Analyse präsentierte die verschiedenen Zellkomponenten als Knoten, während die Linien die Interaktionen bzw. Beziehungen zwischen diesen Komponenten veranschaulichten. Die Knoten/Zellen waren grün eingefärbt, wobei die Intensität der Grünfärbung mit der Anzahl der Gene in den jeweiligen Clustern korrelierte. Eine intensivere Färbung wies auf eine höhere Dichte von Genen in diesem Cluster hin.

3.2. Materialliste

3.2.1. Substanzen und Lösungen/Chemikalien

Substanzen/Lösungen	Hersteller	Experimente
Buffer RLT Lysis buffer 45 ml Lot: 166042210	Qiagen, Venlo, Niederlande / Hilden DE	2
Buffer Wash buffer, Guanidinhaltiger Waschpuffer (RW1) 45 ml Lot: 166042210	Qiagen, Venlo, Niederlande / Hilden DE	2
Buffer Wash buffer, Ethanolhaltiger Waschpuffer (RPE) 11 ml concentrate - add 44 ml Ethanol Lot: 166034057	Qiagen, Venlo, Niederlande / Hilden DE	2
DNase/Rnase freies destilliertes Wasser 500 ml Lot: 2183135	Invitrogen UltraPureTM, Carlsbad, CA, USA	2
Ethanol absolute, 99.9 %	ChemSolute, Renningen, Germany	
Fluoromount-G 25 ml	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA	1
Normal Goat Serum (5% in PBS, Selbstherstellung)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	1
Objektträger 72 st./pcs. 25x75x1.0 mm	VWR International bvba, Leuven, Belgien	1
Paraformaldehyd (PFA) (4% in PBS, Selbstherstellung)	Sigma Aldrich, St.Louis, MS, USA	1
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	1
RNA-Free Water 10 ml Lot: 166039271	Qiagen, Venlo, Niederlande / Hilden DE (RNA Kit)	2
RNeasy Mini Kit (50) Lot No. : 166045545	Qiagen, Venlo, Niederlande / Hilden DE	2
ROTI Histofix , 4 % Formaldehyd, pH7	Carl Roth, Karlsruhe, Germany	1
Triton X (Tx)-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	1
Tissue- Tek 125ml	Sakura Finetek, Nagano, Japan	1

Tbl. 1: Verwendete Substanzen und Lösungen werden mit Herstellerangaben für diverse Experimente angegeben. 1= Immunhistochemie; 2= RNA-Sequenzierung/Extraktion

3.2.2. Geräte

Geräte Name	Verwendungszweck	Hersteller	Experiment
Eppendorf Thermomixer Comfort 5436	Hitzeschüttler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	
Keyence Biorevo BZ-9000 Microscope	Immunfluoreszenz-mikroskop	Keyence, Osaka, Japan	1
Leica Cm3050S Kryostat	Herstellung von gefroren geschnittenen Gehirnpräparaten	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	1
Mikrozentrifuge, VWR MICRO STAR 17R	Zentrifugation	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA	2
Mixer	Zerkleinerung Hirngewebe		2
Nanodrop One	Messung RNA-Konzentration	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	2

Tbl. 2: Benötigten Geräte mit Herstellerangaben für diverse Experimente, 1= Immunhistochemie; 2= RNA-Sequenzierung/Extraktion

3.2.3. Computerprogramme/ Software

Software Name	Verwendungszweck	Hersteller	Experiment
BZ-2 Analyzer (Version 2.2)		Keyence, Osaka, Japan	1
BZ-2 Viewer (2.2)	Programm zur Darstellung digitaler mikroskopischer Bilder	Keyence, Osaka, Japan	1
GIMP, GNU Image Manipulation Program Free Software Foundation	Bildverarbeitungsprogramm	GIMP Development Team	1
Graph Pad Prism Version 6	Statistische Analysen	GraphPad Software, San Diego, USA	1,2
ImageJ R (Fiji-Version)	Bildverarbeitungsprogramm, Auswertung	National Institutes of Health, Bethesda, USA	1
Microsoft Office Excel		Microsoft, Redmond, USA	2
Microsoft PowerPoint		Microsoft, Redmond, USA	2
Microsoft Word		Microsoft, Redmond, USA	2

Tbl. 3: Verwendete Software, die für die Analyse der Ergebnisse der verschiedenen Experimente verwendet wird. 1= Immunhistochemie; 2= RNA-Sequenzierung/Extraktion

3.2.4. Antikörper

Primär-antikörper	Beschreibung, markierte Zellen	Verdünnung	Hersteller	Experimente
Anti-Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1)	Primärer Kaninchen-Antikörper, Mikroglia	1 : 500	Fujufilm, Osaka Japan	1
Neuronal nuclei (NeuN), Lot:2028800	Primärer-Kaninchen Antikörper, Neuronen	1:500	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen) Waltham, MA, USA	1

Tbl. 4: Verwendete Primärantikörper mit Verdünnungs- und Herstellerangaben für 1 = Immunhistochemie

Sekundär-antikörper	Host	Antigen	Verdünnung	Hersteller	Experimente
Alexa Fluor® Goat anti mouse 488 Lot: 2220848	Ziege	Maus Immunglobulin G (IgG)	1:200 1:500	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	1
Alexa Fluor® Goat anti rabbit 568 Lot: 2156532	Ziege	Kaninchen IgG	1:200 1:500	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	1

Tbl. 5: Verwendete Sekundärantikörper mit Verdünnungs- und Herstellerangaben für 1= Immunhistochemie

3.2.5. Fluoreszenzfarbstoff

Fluoreszenz-farbstoff	Beschreibung, markierte Zellen	Verdünnung	Hersteller	Experimente
Hoechst 333342	DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff zur Kernfärbung	gemäß Hersteller-angaben	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Germany	1

Tbl. 6: Verwendeter Fluoreszenzfarbstoff mit Verdünnungs- und Herstellerangaben für 1= Immunhistochemie

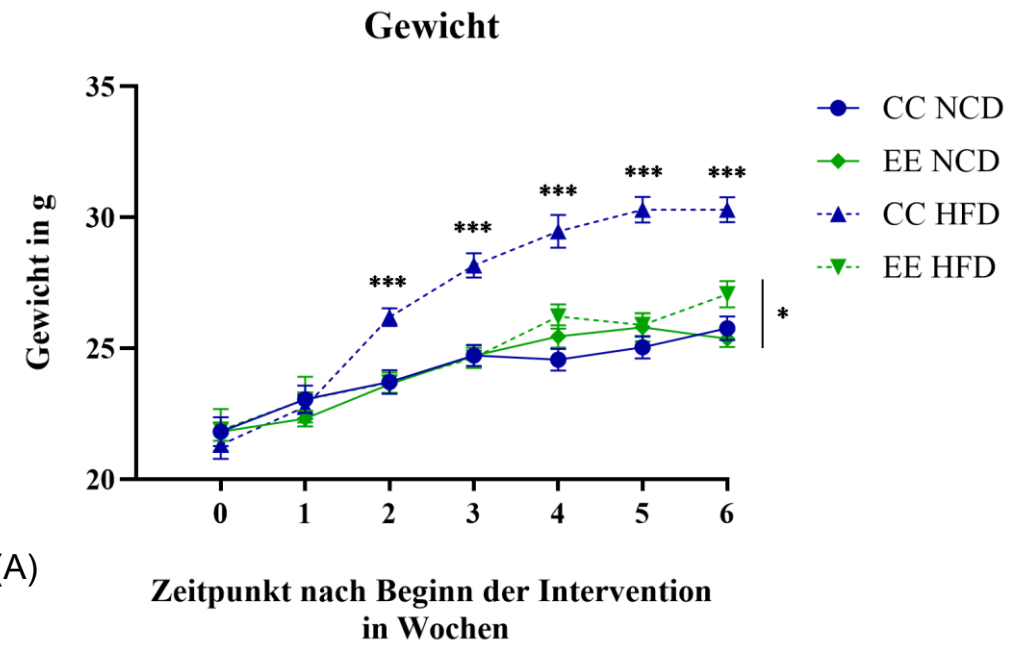
4. Ergebnisse

4.1. Vorarbeiten/Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

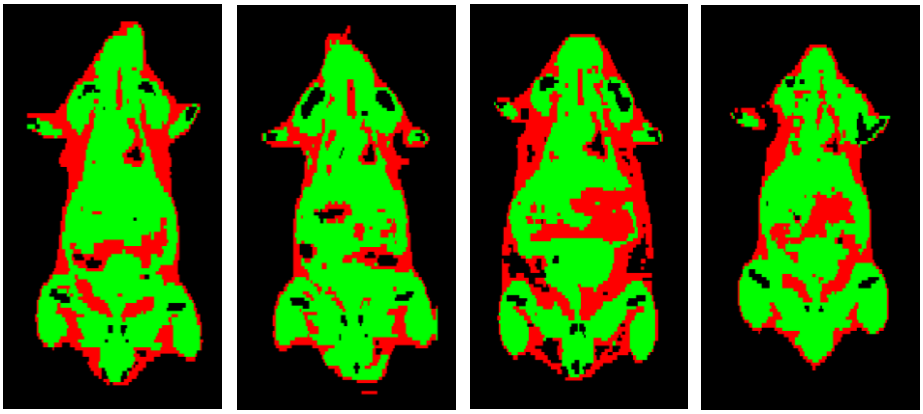
Da diese Arbeit, wie oben beschrieben, Teil eines größeren Projektes ist, werden hier kurz die wichtigsten Vorergebnisse dargestellt. In einem ersten Versuch wurden die Auswirkungen von EE und HFD auf den Körper in Tieren ohne Schlaganfall untersucht. Hier lag der Fokus auf der Quantifizierung von metabolischen Parametern, wie der Messung der Glukose- und Insulintoleranz, dem Hirnmetabolismus mittels FDG-PET sowie Messungen in einer metabolischen Kammer (PhenomasterTM), die den Kalorienverbrauch über die Zeit dynamisch darstellen konnten. Zudem erfolgten behaviorale Messungen im Open Field Test, sowie ebenfalls im Phenomaster, welcher Lokomotion und Feinmotorik aufzeichnete.

In dem Paper von Ladwig et al. (aktuell in Revision) konnte gezeigt werden, dass EE ausreichte, um Mäuse vollständig vor einer durch HFD induzierten Gewichtszunahme zu schützen. Nur in der CC HFD Gruppe wurde ein signifikant erhöhtes Gewicht beobachtet, während zwischen den übrigen Gruppen keine signifikanten Unterschiede zeigten (Abb. 12A). Auch CT-Untersuchen des Körperfett- und des Muskelanteils bestätigten, dass phänotypisch die EE HFD Tiere nicht signifikant unterschiedlich waren zu den NCD-Gruppen (Abb. 12B). Die CC HFD Tiere zeigten im Vergleich zu EE HFD, CC NCD und EE NCD eine deutlich vermehrte Fettmasse (CC HFD: 34,18 % ± 9,10%; EE HFD: 26,45%± 4,78%; CC NCD: 27,41%± 2,84%; EE NCD: 25,41% ± 2,36%, siehe Abb. 12B, C).

HFD bewirkt eine Gewichtszunahme nur in sedativer Umgebung

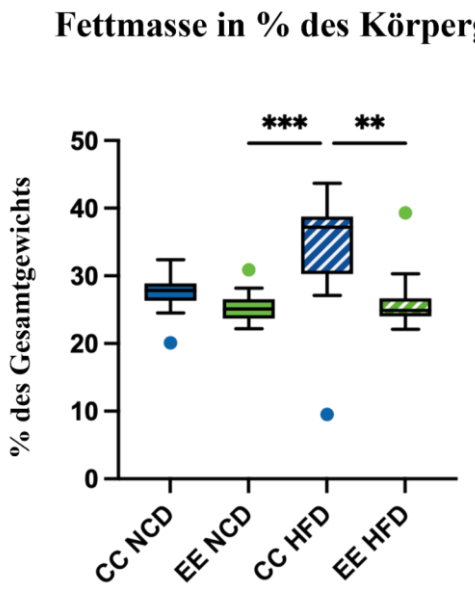


(A)



CC EE CC EE

(B)



(C)

*Abb. 12: Phänotyp nach 6 Wochen EE- und Diätintervention: EE bestimmt das Gewicht und die Körpermasseverteilung, (A) Gewichtsentwicklung über 6 Wochen zeigt einen signifikanten Anstieg des Gewichts in der CC HFD-Gruppe ab Woche 2 im Vergleich zu den anderen Gruppen. B) repräsentative CT-Bilder der Körpermassezusammensetzung und Fettverteilung zeigen, eine vermehrte Fettmasse (rot) in der CC HFD-Gruppe und Zunahme der fettfreien Masse (grün) in beiden EE-Gruppen (C) Fettmasse (in %) in CC HFD erhöht (Ladwig et al. in Revision), Ergebnisse ± SEM, Statistik: 1W ANOVAs für jede Woche, Signifikanzen: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. Abbildung aus Ladwig et al. (in Revision)*

CC = Kontrollkäfig, EE = angereicherte Umgebung, NCD = normale Diät, HFD = fettreiche Diät

Sechs Wochen nach Beginn der Intervention wurden Glukose- und Insulintoleranztests durchgeführt, die unabhängig von den Haltungsbedingungen ernährungsabhängige Unterschiede zeigten. Die Glukosetoleranz war unabhängig von der Umgebung durch die HFD-Intervention signifikant verringert. Die Nüchternglukose (nach sechs Stunden Fasten) und die basalen Glukosewerte waren jedoch bei CC HFD nur leicht erhöht, ohne signifikante Unterschiede, was der klinischen Situation von Prädiabetes entspricht.

In den Insulintoleranztests zeigten sich bereits 15 Minuten nach Verabreichung ernährungsbedingte Unterschiede in der Reaktion auf Insulin. In den HFD-Gruppen sank der Glukosespiegel um etwa 15 %, in den NCD-Gruppen wurde eine Reduktion von rund 30 % beobachtet – und das unabhängig von der Umgebung. Nach 30 Minuten betrug die Abnahme in den HFD-Gruppen etwa 20 %, in der CC NCD-Gruppe etwa 40 %, wohingegen die EE NCD-Gruppe bereits wieder einen Anstieg des Blutzuckerspiegels auf etwa 20 % zeigte. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Bewegung, die durch eine

fettreiche Ernährung bedingte Verringerung der Insulinsensitivität nicht verhindern kann. Unter NCD hingegen konnten Mäuse aus der angereicherten Umgebung ihren Blutzuckerspiegel nach Insulinverabreichung schneller stabilisieren als die CC-Gruppe. Dies deutet auf eine mögliche, durch Bewegung induzierte Verbesserung der Glukoseproduktion in der Leber hin.

Im Open-Field-Test zeigten EE-Tiere weniger Angst als CC-Tiere. In den PET-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass HFD eine drastische Reduktion des Glukosestoffwechsels im gesamten Gehirn induziert. EE konnte die Diät-assoziierte Reduktion des zerebralen Glukosestoffwechsels nur teilweise kompensieren. Während in subkortikalen Hirnarealen – darunter Striatum, Corpus callosum, Hypothalamus, Anteile des Hippocampus, Hirnstamm und Kleinhirn – auch unter EE-Bedingungen noch eine signifikante Stoffwechselminderung festgestellt wurde, waren Kortex, Kleinhirn und Thalamus weniger beeinträchtigt. Unter NCD zeigte EE ebenfalls eine regionenspezifische, leichte Verringerung des Hirnstoffwechsels insbesondere in kortikalen Arealen, was möglicherweise auf eine erhöhte Energieeffizienz zurückzuführen sein könnte.

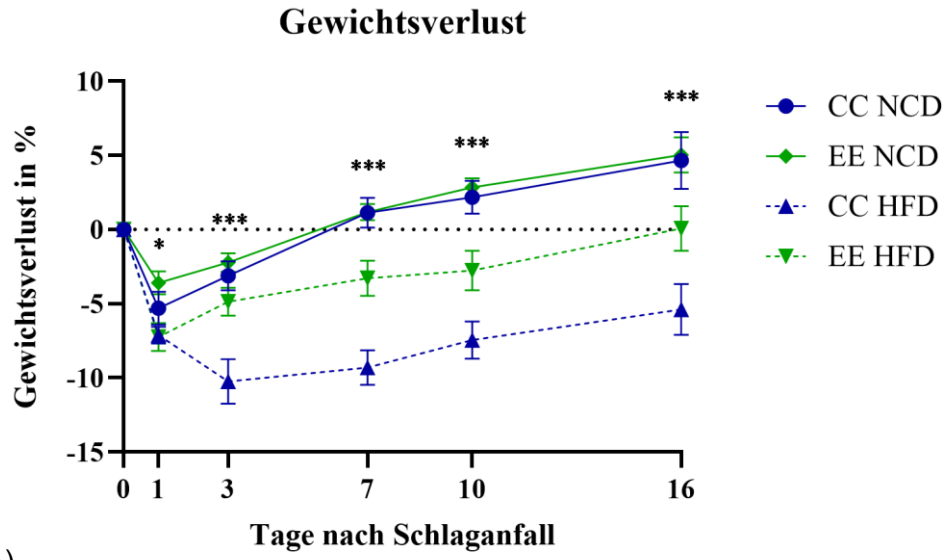
Die Phenomaster-Daten wurden ohne EE-Umgebung erfasst. Unter diesen Bedingungen zeigte die EE HFD-Gruppe das größte Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch, was auf ein hohes Risiko für die Entwicklung von Fettleibigkeit während Phasen des akuten Entzugs aus EE-Bedingungen in dieser Gruppe hindeutet.

Die postmortale Analyse des Gehirngewebes ergab darüber hinaus, dass EE zu einer Abschwächung der durch die Diät induzierten Meta-Entzündung führte. Auch die Neurone zeigten unter EE eine deutlichere NeuN Färbung im Zellkern, welche für eine metabolisch aktive Zelle spricht.

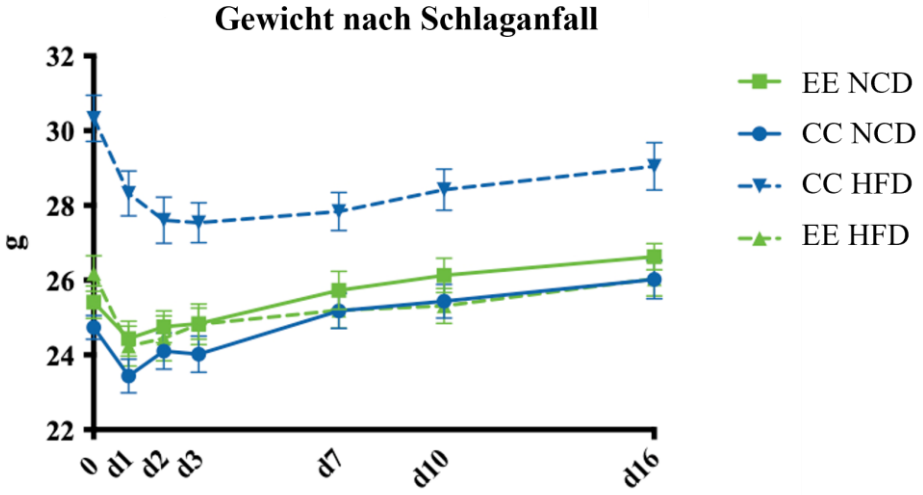
Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass ein durch EE modellierter aktiver Lebensstil in der Lage ist, bestimmte durch eine HFD verursachte Störungen – insbesondere Gewichtszunahme und neuroinflammatorische Prozesse – signifikant zu mildern oder sogar vollständig zu verhindern. Dennoch bleiben wesentliche metabolische Parameter wie die Glukosehomöostase, die Insulinsensitivität und Regionen, die zentral an Gedächtnisbildung, Integration von sensorischen und motorischen Informationen sowie Nahrungsregulation und Stoffwechsel beteiligt sind, beeinträchtigt. Zudem scheint die plötzliche Einstellung körperlicher Aktivität bei anhaltender HFD ein kritisches Risiko für die Entwicklung von Fettleibigkeit darzustellen. Diese Befunde unterstreichen die Notwendigkeit eines ganzheitlichen Gesundheitskonzepts, das körperliche Aktivität und eine ausgewogene Ernährung verbindet. Die möglichen Ursachen der neuronalen

Protektion und reduzierten Neuroinflammation werden im Folgenden untersucht. Im Folgenden werden die eigenen Ergebnisse dargestellt.

4.2. Gewichtsverlust nach Schlaganfall ist am stärksten ausgeprägt in der CC HFD Gruppe



(A)



(B)

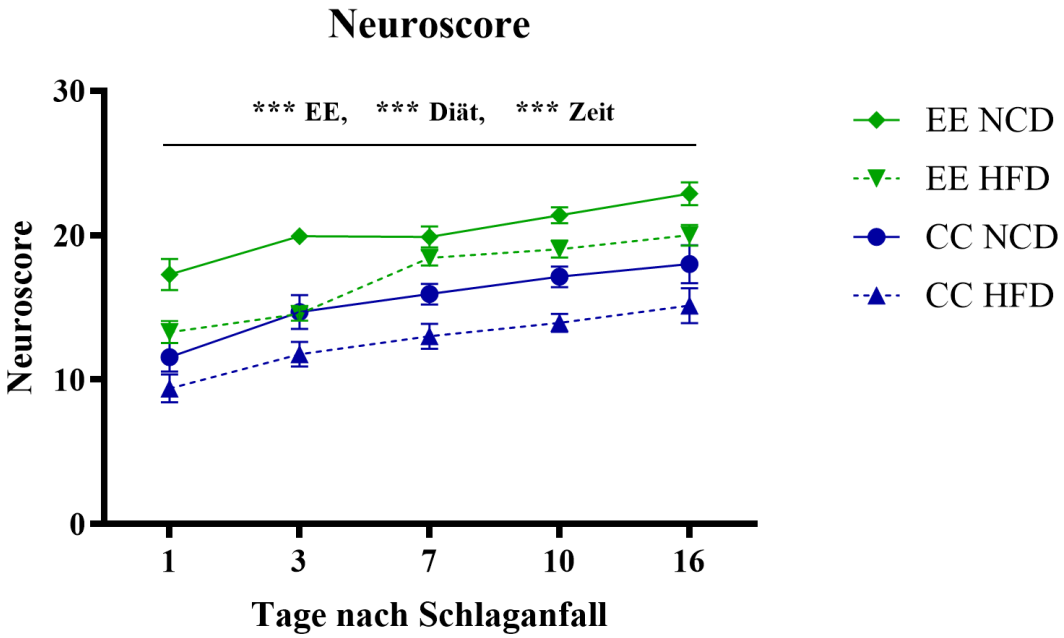
*Abb. 13: A) Gewichtsverlust in Prozent der verschiedenen Gruppen über einen Zeitraum von 16 Tagen nach Schlaganfall. B) Gewicht nach Schlaganfall (Ladwig et al. submitted to Cell Reports) Die Fehlerbalken stellen SEM dar. Ergebnisse in % ± SEM, Statistik: 1W ANOVAs für die Tage, Signifikanzen: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. CC NCD: n = 18; CC HFD: n = 18, EE NCD: n = 18; EE HFD n = 25*

Um die metabolischen Veränderungen nach Schlaganfall besser zu verstehen, wurden die Tiere an den Tagen 1, 3, 7, 10 und 16 gewogen. Am ersten Tag nach der Photothrombose wurde in jeder Gruppe ein Gewichtsverlust im Vergleich zum Ausgangsgewicht festgestellt: In der CC NCD-Gruppe wurde ein Gewichtsverlust von - *5,31 % ± 1,11*, in der EE NCD-Gruppe von - *3,60 % ± 0,78*, in der CC HFD-Gruppe von - *7,12 % ± 0,56* und in der EE HFD-Gruppe von - *7,24 % ± 0,94* beobachtet.

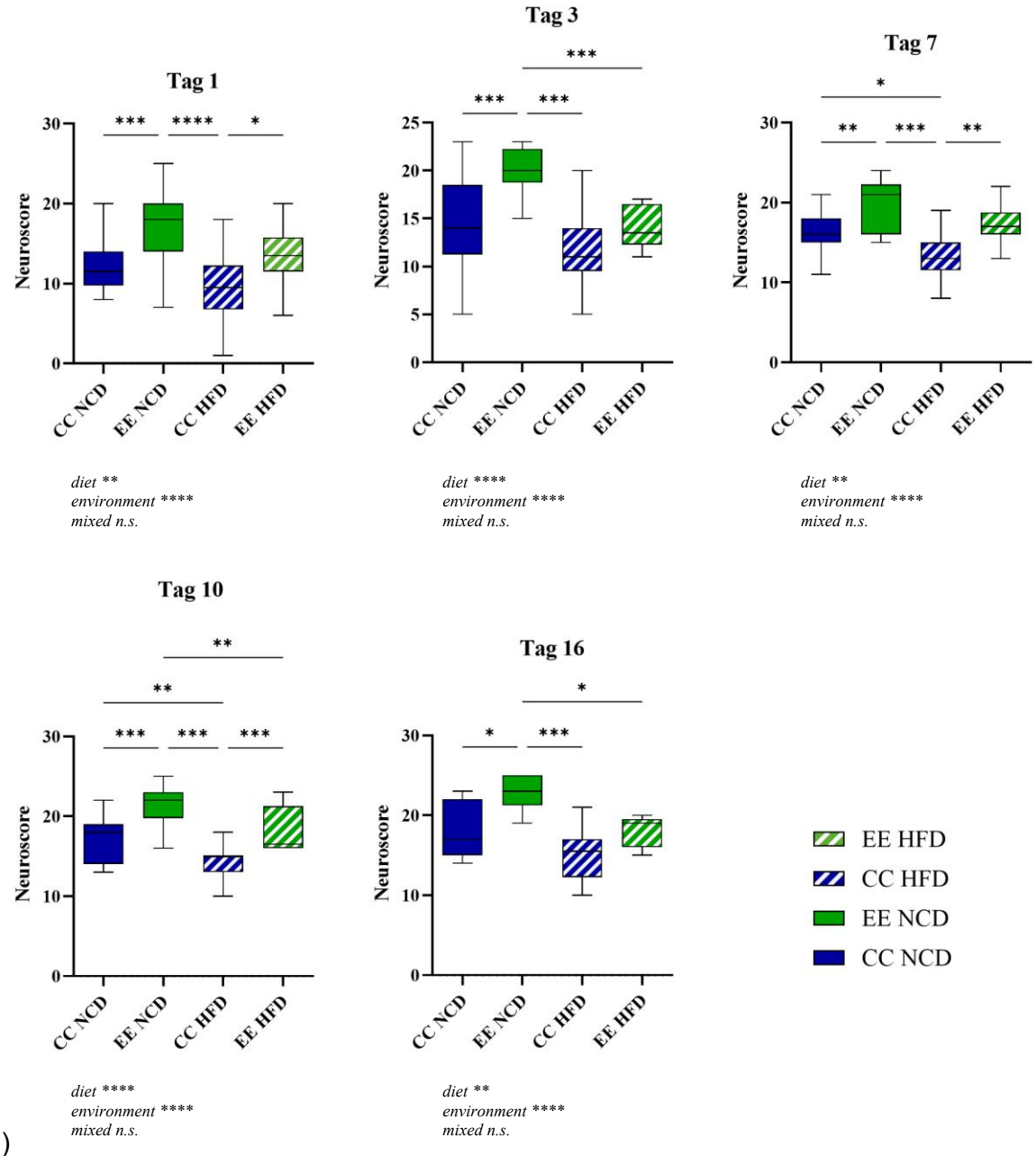
Nach dem ersten Tag nahm das Gewicht nach dem anfänglichen Verlust in den Gruppen CC NCD, EE NCD und EE HFD stetig zu. CC NCD und EE NCD zeigten einen ähnlichen Anstieg und Verlauf und erreichten bis Tag 7 wieder ihr Ausgangsgewicht (+ *1,13 % ± 1.02* (CC NCD) und + *1,18 % ± 0,53 (*EE NCD)) und nahmen bis Tag 16 stetig weiter zu.

Im Gegensatz dazu zeigten die HFD-Gruppen einen unterschiedlichen Gewichtsverlauf. Die CC-HFD Gruppe verlor zunächst zunehmend an Gewicht bis zum Tag 3 (- *10,24 % ± 1,50)* und erholte sich nicht vollständig bis Tag 16 (- *5,39 % ± 1,71*). Die EE HFD-Gruppe verlor nach dem initialen Gewichtsverlust wie die NCD-Gruppen kein weiteres Gewicht, nahm allerdings deutlich langsamer an Gewicht zu und erreichte an Tag 16 erst das Ausgangsgewicht (+ *0.071 % ± 1,50).*

4.3. EE-Tiere haben ein funktionell besserer Outcome nach Schlaganfall



(A)



(B)

*Abb. 14: Neuroscore nach Schlaganfall, A) Veränderung des Neuroscores über den Gesamtzeitraum mit Messungen an Tag 1, 3, 7, und 16 nach PT. B) Darstellung nach Tagen: EE NCD Tiere zeigen bereits ein Tag nach PT ein klinisch besseres Outcome als die CC-Gruppen. Der Unterschied bestand fort bis Tag 16. Graphen repräsentieren Mittelwert ± SEM, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001., **** p < 0.0001, ns = nicht signifikant CC NCD: n = 18; CC HFD: n = 18, EE NCD: n = 18; EE HFD n = 24*

Bereits am ersten Tag nach PT war der EE-Einfluss signifikant: Die EE NCD-Gruppe erreichte an Tag 1 einen durchschnittlichen Score von 17,28 (± *1,08 SEM*), was einen signifikanten Unterschied zur CC NCD (*Score: 11,56, ± 0,99 SEM, p = 0,0007* ***), sowie zur CC HFD (Score*: 9,389 ± 0,96 SEM, p < 0,0001*) und zur EE HFD-Gruppe (*Score: 13,36,*

± 1,02 SEM, p = 0,0524) darstellte. In der Varianzanalyse wirkten sich sowohl die Diät (*p = 0,0013*) als auch die Umgebung (*p < 0,0001*) signifikant aus, während kein signifikanter Interaktionseffekt beobachtet wurde *(p = 0,337*).

Am dritten Tag erzielte die EE NCD-Gruppe einen signifikant höheren Neuroscore als alle anderen Gruppen (*Tag 3: EE NCD: 19,94, ± 0,56 SEM, CC NCD: 14,69, ± 1,18 SEM, p < 0,001; CC HFD:11,76 ± 0,84 SEM, p < 0,001; EE HFD-Gruppe: 13,92, ± 0,63 SEM, p < 0,001*). Zu diesem Zeitpunkt konnte sich die EE HFD Gruppe nicht von der CC NCD-Gruppe abheben. Sowohl die Diät (*p < 0,0001*) als auch die Umgebung (*p < 0,0001*) zeigten einen signifikanten Effekt.

Erst ab dem siebten Tag nach der PT zeigte auch die EE HFD-Gruppe signifikante bessere Ergebnisse als die CC-Gruppen (*Tag 7: EE NCD: 19,89, ± 0,72 SEM; CC NCD: 15,93 ± 0,71 SEM, p = 0,003; CC HFD: 13,00 ± 0,87 SEM, p < 0,001; EE HFD-Gruppe: 17,42 ± 0,71 SEM, p = 0,14).* Die CC NCD Gruppe zeigte nun auch höhere Werte als die CC HFD Gruppe. Die Varianzanalyse ergab weiterhin signifikante Effekte für die Diät (*p = 0,0036*) als auch die Umgebung (*p < 0,0001*).

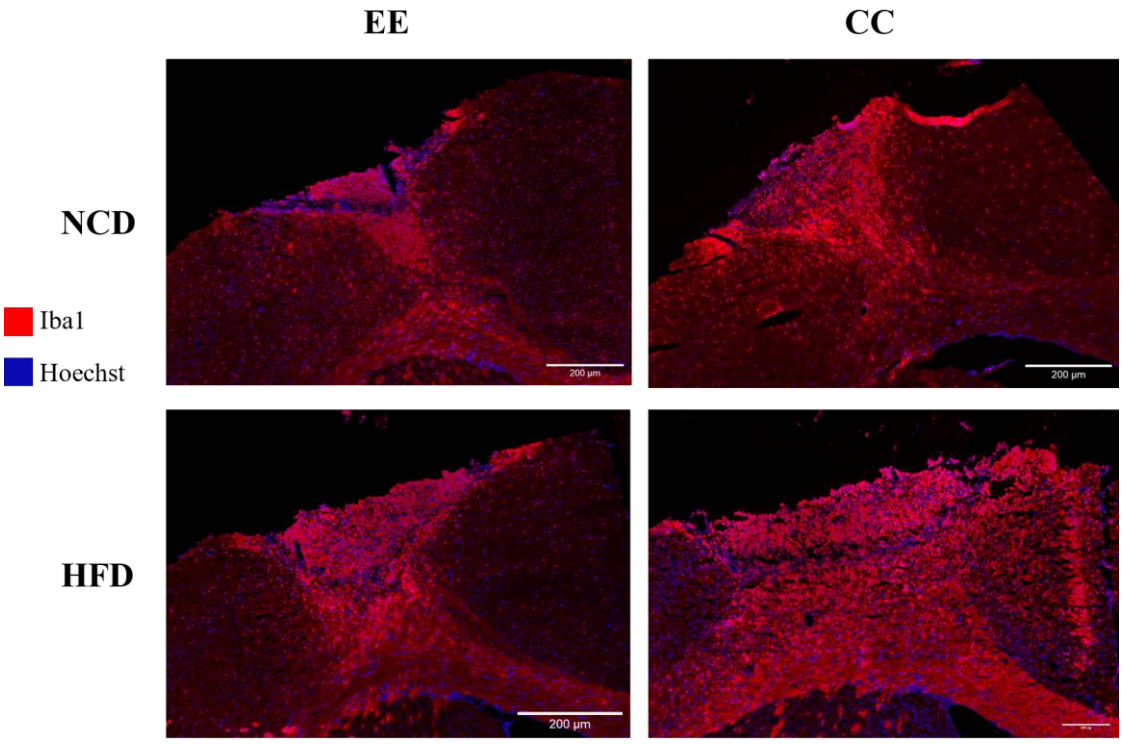
Am zehnten Tag erzielte die EE NCD-Gruppe erneut die höchsten Werte (*21,39 ± 0,55 SEM*) und unterschied sich signifikant von allen anderen Gruppen (*Tag 10: CC NCD: 17,13 ± 0,71 SEM, p < 0,001; CC HFD: 14 ± 0,67 SEM, p<0,001; EE HFD: 18 ± 0,80 SEM, p=0,005)*. Auch die EE HFD-Gruppe und die CC NCD Gruppe zeigten am zehnten Tag weiterhin signifikant bessere Scores als die CC HFD-Gruppe. Die zweifaktorielle Varianzanalyse bestätigte für diesen Zeitpunkt weiterhin signifikante Effekte sowohl der Diät *(p < 0,0001)* als auch der Umgebung *(p < 0,0001)*.

Am 16. Tag wurde in der EE-Gruppe ein Neuroscore von 22,88 *(± 0,79 SEM)* in der NCD-Gruppe und ein Score von 20,00 *(± 0,89 SEM, p=0,04*) in der HFD-Gruppe ermittelt. Die Ergebnisse der CC-Gruppe wiesen im Vergleich EE NCD in der NCD-Gruppe einen Neuroscore von 18,00 *(± 1,31 SEM, p=0,02)* und in der HFD-Gruppe einen Score von 15,13 *(± 1,22 SEM, p<0,001*) auf, welche sich ebenfalls signifikant von den Ergebnissen der anderen Gruppen unterschieden. Die Diät (*p = 0,0053*) sowie auch die Umgebung (*p < 0,0001*) hatten einen signifikanten Einfluss.

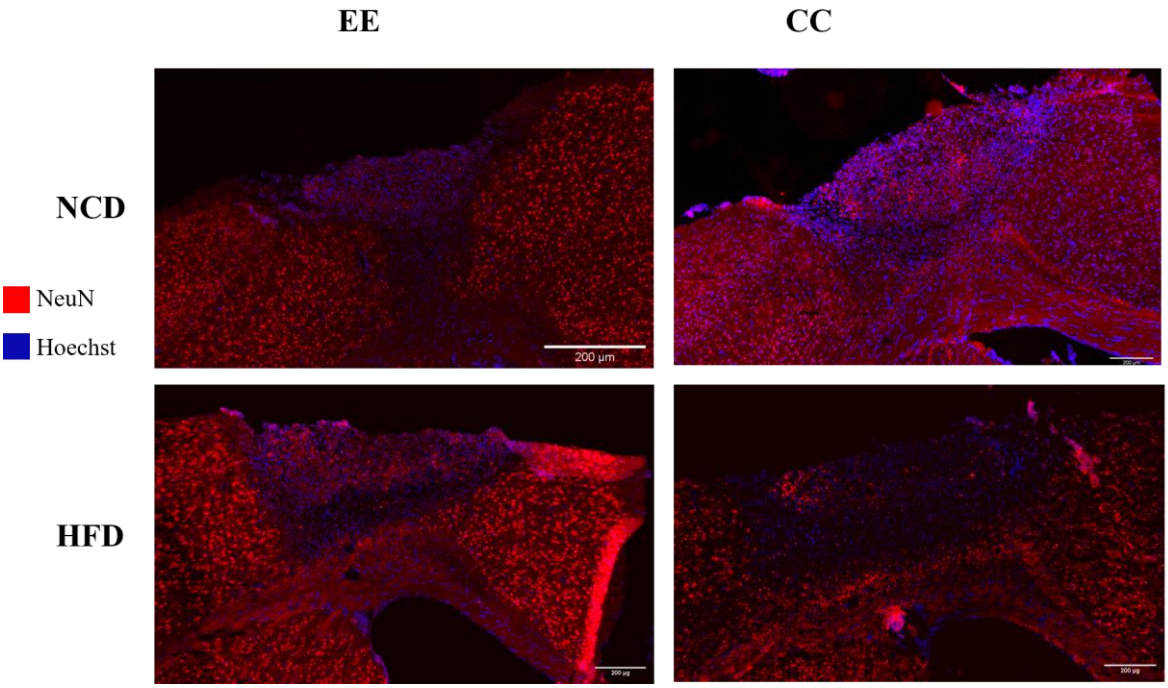
Zusammenfassend zeigte sich in den ersten Tagen nach dem Schlaganfall bei der CC HFD-Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen eine signifikant schlechtere funktionelle Erholung. Die EE HFD-Gruppe entwickelte sich ähnlich wie die CC NCD-Gruppe, erzielte

jedoch ab Tag 7 bessere Ergebnisse, während die EE NCD-Gruppe insgesamt die besten Ergebnisse im gesamten Verlauf erreichte. Damit setzte sich der positive EE-Effekt auch unter fettreicher Diät zunehmend durch.

4.4. EE begrenzt die Entzündung und schützt die umliegenden Neurone



(A)



(B)

Abb. 15: Zellverteilung im Schlaganfall- und Periinfakrtareal, A-B) Immunohistochemische koronare Schnitte des Mausgehirns auf Höhe der gesetzten Läsion (Photothrombose), A) Iba1-Färbung (rot= Mikroglia, blau = Zellkerne) zeigt die Verteilung und Aktivierung von Mikrogliazellen im Infarkt- und Periinfarktareal B) NeuN-Färbung markiert die neuronale Verteilung und die Dichte der Neuronen

Um die zellulären Prozesse hinter den funktionellen und metabolischen Unterschieden besser zu verstehen, analysierten wir die Verteilung der Neurone und Mikroglia im Periinfarktareal zunächst qualitativ. Auffällig war, dass die Entzündung in den EE-Gruppen größtenteils auf den Infarktbereich beschränkt war, während sie in den CC-Gruppen und insbesondere unter HFD deutlich über die Infarktgrenzen hinausging. Dies manifestierte sich in einer verstärkten Aktivierung der Mikroglia (Iba1 + Zellen) und deren Verteilung im umgebenden Gewebe in der CC HFD-Gruppe (siehe Abb. 15A).

Die Neurone in den EE-Tiere reichten bis nahe an den Infarktrand heran und zeigten intakte Zellstrukturen, während in den CC-Gruppen die Neurone am Infarktrand schwächer angefärbt waren, unregelmäßige Ränder aufwiesen und teilweise fragmentiert erschienen (Abb. 15B).

4.5. RNA – Sequenzierung des Kleinhirns

4.5.1. Vorauswertung: Sample Distance Plot

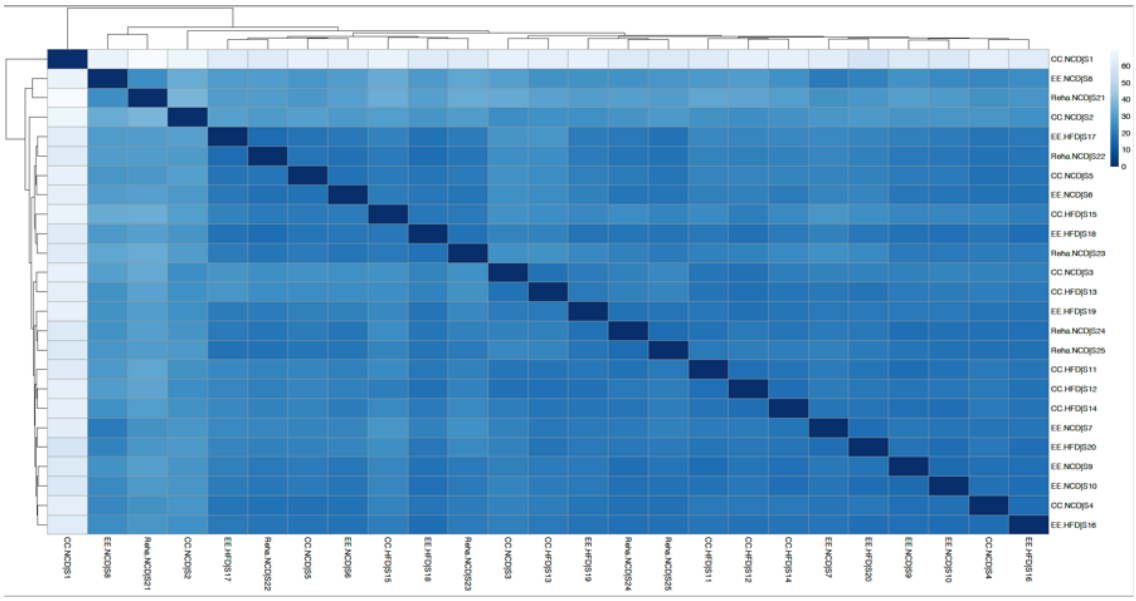


Abb. 16: Heatmap Sample Distance plot, Ausschluss Probe 1

Der Sample Distance Plot veranschaulichte die Unterschiede in der Gen-Expression zwischen den Proben. Probe 1, S1, wurde als Outlier identifiziert, da sie sich deutlich von den anderen Proben abhob. Um mögliche Verzerrungen in den Ergebnissen zu vermeiden, wurde Probe 1 für weitere Analysen ausgeschlossen.

4.6. Identifizierung der am stärksten von EE beeinflussten Gene

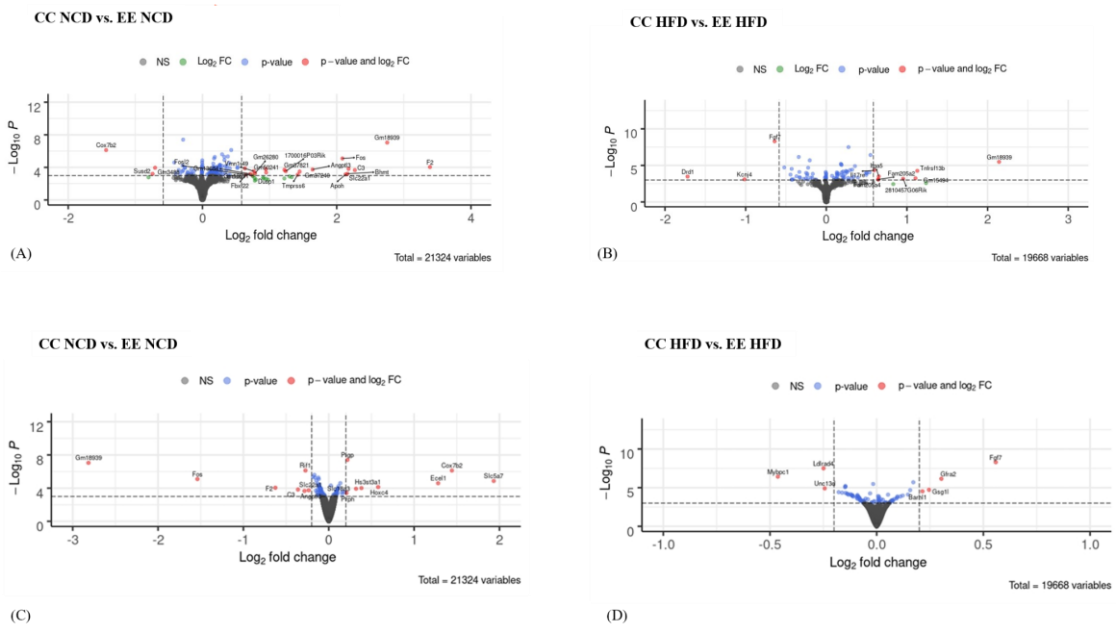


Abb. 17: Volcano plots zeigen die am stärksten veränderten Gene zwischen den Einzelgruppen (apeglm (A) CC NCD vs. EE NCD und (B) CC HFD vs. EE HFD, ahsr (C) CC NCD vs. EE NCD und (D) CC HFD vs. EE HFD) Signifikant veränderte Gene sind farblich hervorgehoben (Rot: p<0,001 und $log_2FC>0,5$; Grün: p>0,001 und $log_2FC > 0,5$; Blau: p<0,001 und $log_2FC <0,5$).

Die Volcano plots wurden die Gene dargestellt, die am stärksten durch EE beeinflusst waren (Abb. 17). Die Tabelle 6 zeigte die am stärksten veränderte Gene aus den Vergleichen CC NCD versus EE NCD in den statistischen Analysen *apeglm* und *ashr, normal* und *invertiert*. Das Atmungsketten-Gen *Cox7b2*, das Gen für das Endothelin converting Enzym-like 1 *Ecel1*, das Homeobox-Gen *Hoxc4*, sowie der Natrium/Chlorid Kanal *Scl5a7* kamen in den meisten Auswertungen vor und waren in EE NCD hochreguliert. In CC erschienen das für den Gerinnungsfaktor Prothombin kodierende Gen *F2*, das Komplement-Gen *C3*, das Apoptose-Gen *Fos* und das für das Apolipoprotein H kodierende Gen *Apoh* hochreguliert. Auffällig war, dass die Invertierung bei der Apeglm Methode ein teilweise anderes Gen-Panel ergab.

Methode	Hochreguliert in EE	Runterreguliert in EE
Apeglm, log2fold change >0,5/ <-0,5; p- Wert (p-value) < 0,001	*Gm3488, Susd2, Skap1, Ahnak2, Vill, Ighm, Cox7b2, Hs3st3a1, Chodl, Hoxc4, Ecel1, 4930426D05Rik, Prph, Slc5a7*	*Gm16091, Irf9, Dusp1, Fosl2, Fbxl22*
Apeglm, inverted; log2fold change >0,5/ <-0,5; p-value < 0,001	*Cox7b2, Gm3488, Susd2*	*Gm18939, F2, Fos, C3, Slc22a1, Bhmt, Apoh, Angptl3, Gm37240, Gm37821, Gm 50241, Gm13684, Gm26280, Irf9, Dusp1, Fosl2, Mov10, Gm16091, Vmn1r49, Tmprss6*
Ashr, log2fold change >0,5/ < -0,5; p-value < 0,001	*Hoxc4, Ecel1, Cox7b2, Slc5a7*	*Gm18939, Fos, F2*
Ashr, inverted; log2fold change >0,5/ <-0,5; p-value < 0,001	*Hoxc4, Ecel1, Cox7b2, Slc5a7*	*Gm18939, Fos, F2*
Ashr, inverted; log2fold change >0,25/ <-0,25; p-value < 0,001	*Hoxc4, Ecel1, Cox7b2, Slc5a7, Hs3st3a1, Pigp, Prph, Slc18a3*	*Gm18939, Fos, F2, C3, Angptl3, Slc22a1, Rif1*

Tbl. 7: angewendete Methoden im Gruppenvergleich EE NCD vs CC NCD

Insgesamt (ashr + apeglm) hochregulierte Gene in EE bei normaler Diät waren *Gm3488, Susd2, Skap1, Ahnak2, Vill, Ighm, Cox7b2, Hs3st3a1, Chodl, Hoxc4, Ecel1, 4930426D05Rik, Prph, Slc5a7, Pigp* und *Slc18a*. Runterreguliert waren *Gm18939, F2, Fos, C3, Slc22a1, Bhmt, Apoh, Angptl3, Gm37240, Gm37821, Gm 50241, Gm13684, Gm26280, Irf9, Dusp1, Fosl2, Mov10, Gm16091, Vmn1r49, Tmprss6, Rif1, Irf9* und *Fbxl22*.
Ungeachtet des log2FC fanden wir weiterhin folgende Gene signifikant hochreguliert in EE mit einem nach adjustierten P-Wert von <0,05: *CD83*. Nach den gleichen Maßgaben fanden sich folgende Gene runterreguliert: *Mfap3, Usp9x, Gnpnat1, Selenoi, Qser, Mllt3, Tmem74bos, Tox4.*

Tabelle 8 zeigte die am stärksten veränderten Gene aus dem Vergleich der EE und CC-Gruppe unter HFD. In allen Vergleichen konsistent erhöht unter EE zeigte sich das Wachstumsfaktor - Gen *Fgf7* und das keimzellspezifische/ zum AMPAR-Komplex gehörende Gen *Gsg11*. Runterreguliert zeigte sich vor allem das Myosin-Bindungsprotein-Gen *Mybpc1*.

Methode	Hochreguliert in EE	Runterreguliert in EE
Apeglm, log2fold change >0,5/ <-0,5; p-value < 0,001	*Amd2, Drd1, Doc2a, Six3os1, Camkv, Tox3, Tafa1, Kcnj4, Galnt14, Lrfn2, Cacna1h, Stk32a, Fgf7, Vstm2b, Gsg1l*	*Gm18939, 2810457G06Rik, Ilre17, Mybpc1, Olfr1396*
Apeglm, inverted; log2fold change >0,5/ <-0,5; p-value < 0,001	*Drd1, Kcnj4, Fgf7, Gsg1l*	*Gm 18939, Gm15494, Tnfrsf13b, 2810457G06Rik, Fam205a2, Fam205a4, Itga5, Il17re, Mybpc1, Olfr1396, Gprin3*
Ashr, log2fold change >0,5/ <-0,5; p-value < 0,001	*Fgf7*	
Ashr, inverted; log2fold change >0,5/ <-0,5; p-value < 0,001	*Fgf7*	
Ashr, inverted; log2fold change >0,25/ <-0,25; p-value < 0,001	*Fgf7, Gfra2, Gsg1l, Barhl1*	*Mybcp1, Ldlrad4, Unc13d*

Tbl. 8: angewendete Methoden im Gruppenvergleich EE HFD vs CC HFD

Insgesamt zeigten sich somit folgende Gene (ashr + apeglm, normal + invertiert) hochreguliert unter EE und HFD: *Amd2, Drd1, Doc2a, Six3os1, Camkv, Tox3, Tafa1, Kcnj4, Galnt14, Lrfn2, Cacna1h, Stk32a, Fgf7, Vstm2b, Gsg1l, Barhl*. Folgende Gene fanden wir am stärksten runterreguliert unter EE und HFD: *Gm18939, Gm15494, 2810457G06Rik, Ilre17, Mybpc1, Olfr1396, Tnfrsf13b, 2810457G06Rik, Fam205a, Fam205a4, Itga5, Gprin3, Ldlrad4, Unc13d.*

Ergänzend und ungeachtet des log2FC waren folgende weitere Gene mit einem adjustierten P-Wert von <0,05 hochreguliert in EE: *Gfra2, Thy1, Gsg1l, Faim.* Runterreguliert fanden wir: *Ppm1h, Setd1a, Sez6l*.

Die Tabellen 9 und 10 präsentieren zusammenfassend die Ergebnisse der Gruppenvergleiche EE NCD vs. CC NCD und EE HFD vs. CC HFD mit den oben genannten (o.g.) Genen aus den Volcano Plots sowie die signifikantesten Gene (adjusted p-value (padj) < 0.05) mit ihrer funktionellen Einordnung.

Gen Symbol	Beschreibung	Kategorie	log2FC	pvalue	padj
NCD					
Pigp	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class P [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1860433]	Neuroprotektion	0,286359	3,94E-08	0,000841
Cox7b2	cytochrome c oxidase subunit 7B2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1925424]	Stoffwechel	1,435827	7,52E-07	0,004009
Slc5a7	solute carrier family 5 (choline transporter), member 7 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1927126]	Neuroprotektion	4,092298	1,38E-05	0,024518
Cd83	CD83 antigen [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1328316]	Neuroprotektion, Immunregulation	0,423031	2,51E-05	0,039195
Ecel1	endothelin converting enzyme-like 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1343461]	Neuroprotektion	2,794866	2,57E-05	0,039195
Hoxc4	homeobox C4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96195]	Neuroprotektion	2,163911	7,35E-05	0,062671
Hs3st3a1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1333861]	Neuroprotektion	1,752338	9,82E-05	0,064741
Slc18a3	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1101061]	Neuroprotektion	5,564772	1,18E-04	0,064741
Gm3488	predicted gene, 3488 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3781665]	Sonstige	0,703273	1,11E-04	0,064741
Vill	villin-like [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1201781]	Neuroprotektion	1,483815	2,77E-04	0,098623
Chodl	chondrolectin [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2179069]	Neuroprotektion	1,793427	2,95E-04	0,098734
Ighm	immunoglobulin heavy constant mu [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96448]	Immunregulation	1,249871	3,80E-04	0,108771
Prph	peripherin [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97774]	Neuroprotektion	2,691513	3,74E-04	0,108771
4930426 D05Rik	RIKEN cDNA 4930426D05 gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1921894]	Sonstige	2,365164	5,03E-04	0,121838
Skap1	src family associated phosphoprotein 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1925723]	Immunregulation	1,169090	5,57E-04	0,132062
Susd2	sushi domain containing 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1918983]	Neuroprotektion	0,750663	6,29E-04	0,138810
Ahnak2	AHNAK nucleoprotein 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2144831]	Neuroprotektion	1,358868	9,67E-04	0,162380
HFD					
Fgf7	fibroblast growth factor 7 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95521]	Neuroprotektion	0,641227	5,13E-09	0,000101
Gfra2	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1195462]	Neuroprotektion	0,346714	7,10E-07	0,003489
Thy1	thymus cell antigen 1, theta [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98747]	Neuroprotektion	0,205193	2,01E-06	0,007905

Gsg1l	GSG1-like [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2685483]	Neuroprotektion	0,516869	1,91E-05	0,033896
Faim	Fas apoptotic inhibitory molecule [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1344387]	Anti-Apoptose	0,226086	2,07E-05	0,033896
Barhl1	BarH like homeobox 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1859288]	Neuroprotektion	0,428410	2,97E-05	0,044882
Drd1	dopamine receptor D1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:99578]	Neuroprotektion	1,721056	3,35E-04	0,131921
Camkv	CaM kinase-like vesicle-associated [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2384296]	Neuroprotektion	1,256436	4,26E-04	0,152883
Tafa1	TAFA chemokine like family member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2443695]	Neuroprotektion	1,194791	4,74E-04	0,152883
Six3os1	SIX homeobox 3, opposite strand 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1925118]	Neuroprotektion	1,430746	6,60E-04	0,183851
Tox3	TOX high mobility group box family member 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3039593]	Anti-Apoptose	1,203807	7,68E-04	0,203517
Kcnj4	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104743]	Neuroprotektion	1,016529	7,93E-04	0,203517
Galnt14	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1918935]	Apoptose, Immunregulation	0,752949	8,27E-04	0,203517
Stk32a	serine/threonine kinase 32A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2442403]	Neuroprotektion	0,048558	2,03E-02	0,423177
Doc2a	double C2, alpha [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:109446]	Neuroprotektion	0,004242	2,83E-02	0,461133
Amd2	S-adenosylmethionine decarboxylase 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1333111]	Stoffwechsel	0,003832	6,57E-02	0,554141
Vstm2b	V-set and transmembrane domain containing 2B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1914525]	Neuroprotektion	0,005733	2,08E-01	0,737289
Lrfn2	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1917780]	Neuroprotektion	0,003283	2,68E-01	0,780725
Cacna1h	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1928842]	Neuroprotektion	0,001421	6,99E-01	0,941676

Tbl. 9: Hochregulierte Gene in EE, Statistik nach shrunken apeglm

Gen Symbol	Beschreibung	Kategorie	log2FC	pvalue	padj
NCD					
Gm18939	predicted gene, 18939 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:5011124]	Sonstige	-0,011297	8,96E-08	0,000956
Rif1	replication timing regulatory factor 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1098622]	Neuroprotektion	-0,427572	7,45E-07	0,004009

Mfap3	microfibrillar-associated protein 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1924068]	Neuroprotektion	-0,290972	2,47E-06	0,010520
Usp9x	ubiquitin specific peptidase 9, X chromosome [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:894681]	Neuroprotektion	-0,182963	5,28E-06	0,014075
Gnpnat1	glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1858963]	Neuroprotektion	-0,319764	5,22E-06	0,014075
Selenoi	selenoprotein I [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:107898]	Neuroprotektion	-0,377406	4,54E-06	0,014075
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95574]	Apoptose	-0,009712	8,10E-06	0,017474
Qser1	glutamine and serine rich 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2138986]	Neuroprotektion	-0,174197	8,19E-06	0,017474
Mllt3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1917372]	Neuroprotektion	-0,322779	1,25E-05	0,024328
Tmem74b os	transmembrane 74B, opposite strand [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3039588]	Neuroprotektion	-0,400783	2,82E-05	0,040099
Tox4	TOX high mobility group box family member 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1915389]	Neuroprotektion	-0,164413	3,50E-05	0,046642
F2	coagulation factor II [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88380]	Blutgerinnung	-0,003551	9,04E-05	0,064741
Irf9	interferon regulatory factor 9 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:107587]	Imunregulation	-0,524358	9,70E-05	0,064741
Mov10	Mov10 RISC complex RNA helicase [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97054]	Neuroprotektion	-0,516718	1,17E-04	0,064741
Gm16091	predicted gene 16091 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3802007]	Sonstige	-0,632811	1,33E-04	0,069131
C3	complement component 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88227]	Entzündung	-0,005724	1,49E-04	0,075453
Gm50241	predicted gene, 50241 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:6303050]	Sonstige	-0,017204	1,53E-04	0,075635
Angptl3	angiopoietin-like 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1353627]	Lipidstoff-wechsel	-0,008783	1,83E-04	0,084624
Gm37821	predicted gene, 37821 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:5611049]	Sonstie	-0,012812	1,99E-04	0,085245
Slc22a1	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:108111]	Neuroprotektion	-0,005725	2,18E-04	0,087884
Vmn1r49	vomeronasal 1, receptor 49 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1344384]	Sonstige	-0,020151	2,91E-04	0,098734
Gm37240	predicted gene, 37240 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:5610468]	Sonstige	-0,008816	3,27E-04	0,104277
Dusp1	dual specificity phosphatase 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:105120]	Imunregulation	-0,948072	4,21E-04	0,113946
Gm26280	predicted gene, 26280 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:5456057]	Sonstige	-0,017005	5,25E-04	0,125898
Bhmt	betaine-homocysteine methyltransferase [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1339972]	Stoffwechsel	-0,004788	6,10E-04	0,137604
Gm13684	predicted gene 13684 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3649340]	Sonstige	-0,017880	6,47E-04	0,138810
Apoh	apolipoprotein H [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88058]	Blutgerinnung	-0,004426	7,38E-04	0,142440

Fbxl22	F-box and leucine-rich repeat protein 22 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1921415]	Muskelspezifische Gene	-0,642273	7,77E-04	0,146599
Tmprss6	transmembrane serine protease 6 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1919003]	Stoffwechsel	-0,007217	8,10E-04	0,148981
Fosl2	fos-like antigen 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:102858]	Apoptose, Immunantwort	-0,738030	9,87E-04	0,163117
Unc13d	unc-13 homolog D [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1917700]	Immunantwort	-0,000569	9,60E-01	0,993307

HFD

Ldlrad4	low density lipoprotein receptor class A domain containing 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1277150]	Neuroprotektion	-0,268739	3,13E-08	0,000308
Gm18939	predicted gene, 18939 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:5011124]	Sonstige	-0,011297	8,96E-08	0,000956
Mybpc1	myosin binding protein C, slow-type [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1336213]	Muskelspezifische Gene	-0,548088	3,76E-07	0,002466
Gm18939	predicted gene, 18939 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:5011124]	Sonstige	-2,138727	3,34E-06	0,010936
Ppm1h	protein phosphatase 1H (PP2C domain containing) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2442087]	Neuroprotektion	-0,182625	6,08E-06	0,017097
Setd1a	SET domain containing 1A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2446244]	Neuroprotektion	-0,184271	7,41E-06	0,018212
Sez6l	seizure related 6 homolog like [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1935121]	Neuroprotektion	-0,188145	8,71E-06	0,019031
Fam205a4	family with sequence similarity 205, member A4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:5434294]	Sonstige	0,008647	6,08E-02	0,542940
Fam205a2	family with sequence similarity 205, member A2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3701946]	Sonstige	0,008647	6,08E-02	0,542940
Tnfrsf13b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1889411]	Immunregulation	0,006158	9,05E-02	0,609118
Gm15494	predicted gene 15494 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3782940]	Sonstige	-0,003150	2,55E-01	0,771382
Itga5	integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96604]	Neuroprotektion	0,004723	3,55E-01	0,832994
Barhl1	BarH like homeobox 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1859288]	Neuroprotektion	-0,007882	4,05E-01	0,856899
Olfr1396	olfactory receptor 1396 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3031230]	Sonstige	-0,004702	4,78E-01	0,882881
2810457G06Rik	RIKEN cDNA 2810457G06 gene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1920074]	Sonstige	0,002661	4,97E-01	0,888084

Il17re	interleukin 17 receptor E [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1889371]	Entzündung, Apoptose	-0,003288	6,18E-01	0,924005
Gprin3	GPRIN family member 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1924785]	Neuroprotektion	-0,003527	6,31E-01	0,927407

Tbl. 10: Herunterregulierte Gene in EE, Statistik nach shrunken apeglm

Analyse der signifikanten Gene und Literatur-basierte Einteilung in funktionelle Gruppen

Anhand einer ausführlichen Literaturrecherche der in den o.g. Analysen identifizierten Gene erfolgte eine Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen. In den folgenden Tabellen erfolgte eine detaillierte Beschreibung der Gene in jedem Cluster. Die identifizierten Cluster waren folgende: 1) Neuronale Entwicklung, synaptische Integrität, neuronales Überleben (Tbl. 11), 2) Immunregulation sowie der Regulation pro-apoptotischer und pro-inflammatorischer Signalwege (Tbl. 12), 3) anti-apoptotische Gene (Tbl. 13), 4) mitochondriale Gene (Tbl. 14), 5) Blutgerinnung (Tbl. 15), 6) Stoffwechsel (Tbl. 16), 8) muskelfunktionspezifische Gene (Tbl. 17). Die nicht eindeutig zuzuordnenden Gene waren in Tabelle 17 unter der Kategorie „Sonstige“ aufgelistet und wurden hier nicht weiter gruppiert.

Gene, die neuronale Entwicklung, synaptische Integrität und neuronales Überleben fördern	
Gene	**Funktion**
	In EE NCD hochreguliert
Slc18a3	kodiert für den Vesicular Acetylcholine Transporter (VAChT), der eine wesentliche Rolle im cholinergen System des Gehirns spielt und für die Aufnahme von Acetylcholin in synaptische Vesikel verantwortlich ist [133].
Slc5a7	kodiert für einen Natrium- und Chloridionen-abhängigen Transporter, der Cholin zur Acetylcholinsynthese in Neuronen transportiert [134].
Hoxc4	spielt eine zentrale Rolle in der embryonalen Gehirnentwicklung [135].
Chodl	ist ein Transmembranprotein und wichtig für die Synaptogenese und das Wachstum von Motoraxonen [136].
Prph	ist ein Intermedärfilament, das die Zellstruktur und die Stabilität der axonalen und dendritischen Strukturen unterstützt [137].

Vill	reguliert die Zellstruktur und -motilität und gehört zur Familie der Villin-ähnlichen Proteine, die sich durch ihre Fähigkeit zur Bindung von Aktin, einem Strukturprotein im Zytoskelett, auszeichnen [138].
Ahnak2	unterstützt die stressabhängige Exportation von Fgf1, einem Wachstumsfaktor, der für Zellüberleben und Reparaturprozesse wichtig ist [139].
Ecel1	ist eine neuronale Endopeptidase, die entscheidend für die Entwicklung und Regeneration des Nervensystems ist [140].
Hs3st3a1	ist ein essentielles Enzym für die Biosynthese von Heparansulfat, das wichtige Funktionen in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen hat [138].
Gm3488	ist möglicherweise an der Synthese von Glykosylstrukturen beteiligt, die für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen wichtig sind [138].
Susd2	spielt eine wichtige Rolle bei Zelladhäsion und -kommunikation und hat bedeutende Auswirkungen auf die Immunantworten. Es wurde gezeigt, dass Susd2 die Antitumorimmunität von CD8+ T-Zellen unterdrückt, indem es gezielt die Signalübertragung des IL-2-Rezeptors beeinflusst. Diese Modulation der Immunantwort könnte wichtige Implikationen für die Tumorabwehr [141,142].
Pigp	beteiligt an der Synthese von Phosphatidylinositol-Glykan-Ankern (GPI-Ankern), die für die Verankerung von Glykoproteinen in der Zellmembran wichtig sind [143].
Cd83	kodiert für ein Transmembranprotein, das die Antigenpräsentation und Aktivierung von Lymphozyten reguliert und immunsuppressive Eigenschaften besitzt [144,145].
	In EE HFD hochreguliert
Drd1	kodiert für den D1-Subtyp des Dopaminrezeptors und spielt eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung des menschlichen Nervensystems [146,147].
Stk32b	kodiert für ein Protein, das zur Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen, das insbesondere in der Signalübertragung und Regulation von Zellfunktionen, sowie in Signalwegen wie Axonführung, olfaktorische Signalübertragung, Calcium-Spannungskanälen und in der Stress- und Abwehrreaktion involviert ist [148,149].
Fgf7	ist ein Wachstumsfaktor, der für Zellwachstum und Differenzierung in der frühen neuronalen Entwicklung wichtig ist und die Differenzierung sowie Reifung exzitatorischer Synapsen fördert [150,151].
Barhl1	ist ein Transkriptionsfaktor, der die Zellentwicklung und Neuronen-Differenzierung reguliert und eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung des Kleinhirns spielt [152,153].
Tafa1	ist ein sekretorisches Protein aus der Familie der Tafa-Proteine, das an der Regulierung von Neurexinen beteiligt ist, indem es deren posttranslationale Modifikationen beeinflusst und so die Organisation von Synapsen im Gehirn moduliert [154,155].
Lrfn2	ist ein Protein, das für synaptisches Zelladhäsionsmolekül kodiert und an der Regulierung von Synapsen und neuronalen Verbindungen beteiligt ist [156,157].
Kcnj4	ist ein Mitglied der Kaliumkanal-Unterfamilie J, das die Kalium-Homöostase an der postsynaptischen Membran exzitatorischer Synapsen aufrechterhält [158,159].

Gsg1l	ist Bestandteil des AMPAR-Komplexes, reguliert die Signalübertragung in glutamatergischen Synapsen und beeinflusst AMPA-Rezeptorkomplexe [160].
Thy1	kodiert für ein Zelloberflächen-Glykoprotein aus der Immunglobulin-Familie, dass das axonale Wachstum und die synaptische Funktion reguliert [161,162].
Camkv	ist ein Pseudokinase-Protein, das für die Aufrechterhaltung von Dendritenstacheln und die Regulation der synaptischen Übertragung und Plastizität entscheidend ist [163].
Doc2a	ist ein Protein, das überwiegend im Gehirn exprimiert wird [164] und an der kalziumabhängigen Freisetzung von Neurotransmittern beteiligt ist.
Vstm2b	spielt eine wichtige Rolle in der Zellkommunikation und könnte an der Regulierung von Immun- und neuronalen Prozessen beteiligt sein [138].
Gfra2	kodiert für einen Rezeptor und fördert das Überleben peripherer und zentraler Neuronen durch Bindung und Signalübertragung neurotropher Faktoren [165–167].
Cacna1h	kodiert für die Alpha1H-Untereinheit des Cav3.2-Calciumkanals, der den Calciumionenstrom in Nervenzellen reguliert und entscheidend für elektrische Signale und Neurotransmission ist [168,169].
	In EE NCD herunterreguliert
Tox4	ist ein Transkriptionsfaktor, der die Umprogrammierung vom somatischen Zustand zum pluripotenten und neuronalen Schicksal vermittelt und für die Regulation des Zellzyklus und anderer biologischer Prozesse bedeutend ist [170–172].
Mov10	kodiert für eine RNA-Helicase, die entscheidend für die neuronale Entwicklung und Gehirnfunktion, ist, da es RNAs bindet, die mit Aktinbindung, neuronalen Projektionen und dem Zytoskelett assoziiert sind [138,173].
Mfap3	kodiert für Mikrofibrillen, die wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix sind und Zellüberleben regulieren [174].
Usp9x	unterstützt die neuronale Entwicklung durch Verstärkung der Selbsterneuerung neuraler Vorläufer [175,176].
Selenoi	ist ein Enzym, das entscheidend für den Myelinisierungsprozess und die neuronale Entwicklung ist [177].
Gnpnat1	ist beteiligt am Glukosestoffwechsel und der Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin-Biosynthese [178]. Es spielt ebenfalls eine Rolle in der Chondrogenese und kann bei Skelettdysplasien von Bedeutung sein [179].
Mllt3	spielt eine zentrale Rolle in der neuronalen Differenzierung und der Entwicklung von kortikalen Projektionsneuronen [180].
Rif1	kodiert für ein Protein, welches in verschiedenen Zellzyklusstadien nach Replikationsschäden benötigt wird [181].

	In EE HFD herunterreguliert
Itga5	kodiert für die Integrin-Untereinheit Alpha 5, die als Teil des Fibronectin-Rezeptors die Zelladhäsion und Signalübertragung vermittelt und in verschiedenen Krebserkrankungen eine Schlüsselrolle bei Proliferation, Apoptose, Invasion und Metastasierung spielt [182–185].
Gprin3	beteiligt an der neuronalen Erregbarkeit und Signalübertragung, insbesondere im Zusammenhang mit Dopaminrezeptoren und β-Arrestin-Signalkaskaden, sowie an der Regulation des Neuritenwachstums [186,187].
Ldlrad4	(Low-Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 4) ist ein negativer Regulator des TGF-β-Signalwegs, dessen Herabregulation mit erhöhter Zellproliferation, verminderter Apoptose und erhöhter Tumorentwicklung assoziiert ist [188].
Ppm1h	ist eine Magnesium-abhängige Phosphatase, die durch Proteinphosphorylierung, posttranslationale Modifikation, zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Stressreaktionen reguliert [189].
Setd1A	kodiert für ein wichtiges Enzym, das durch Methylierung von Histonen die Genexpression reguliert und somit grundlegende zelluläre Prozesse wie Entwicklung, Differenzierung und Genomstabilität beeinflusst [190] und so für die normale Gehirnentwicklung wichtig ist [191].
Sez6l	ist ein Protein, das zur Sez6-Familie gehört und die synaptische Konnektivität und die motorische Koordination bei Mäusen beeinflusst [192,193].
Mybpc1	kodiert für Myosin-Bindungsprotein C, Typ langsam (sMybp-c), das die Interaktion zwischen Aktin und Myosin reguliert und somit die Kontraktilität von Muskelfasern steuert. Es wurde mit Myopathien und Tremor in Verbindung gebracht [194] und klassifiziert zusammen mit anderen Proteinen Subpopulationen von VIP-exprimierenden Interneuronen in der Großhirnrinde [195].

Tbl. 11: Hoch - und Herunterregulierte Gene in EE-Gruppe, die neuronale Entwicklung, synaptische Integrität und neuronales Überleben fördern

Gene für pro-apoptotische und pro-inflammatorische Wege und Immunregulation	
Gene	**Funktion**
	In EE NCD hochreguliert
Ighm	ist ein essentielles Gen für die Produktion von IgM-Antikörpern, die eine zentrale Rolle in der frühen Immunantwort und Aktivierung des Komplementsystems spielen [196].
Skap1	kodiert für ein Protein, das in T-Lymphozyten vorkommt und wichtig für die T-Zell-Aktivierung und -Funktion ist [197].

	In EE HFD hochreguliert
Galnt 14	kodiert für ein Enzym Galnt 14 gehört zur Familie der Polypeptid-N-Acetylgalaktosaminyltransferasen und spielt eine Rolle bei der Glykosylierung von Proteinen. Insbesondere in der Tumorentwicklung (Infiltration von M2-Makrophagen in hepatozelluläres Karzinom-Tumorgewebe), Zellmigration, Gewebsinvasion und apoptotischen Signalübertragung zeigt Galnt14 eine bedeutende Funktion und wird daher als potenzieller Biomarker für die Krebstherapie und -prognose in Betracht gezogen [198,199].
	In EE NCD herunterreguliert
Fos	ist ein Proto-Onkogen, das eine entscheidende Rolle bei der p53-abhängigen Aktivierung der Apoptose spielt und als zentrales Mitglied des AP-1-Transkriptionskomplexes wichtige Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose reguliert [200,201].
Dusp1	ist eine Phosphatase, die MAP-Kinasen dephosphoryliert und somit die Regulation von zellulären Signalwegen und Immunreaktionen steuert [202].
Fosl2	ist ein Transkriptionsfaktor, der die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen hemmt und an der Regulation von Autoimmunität sowie der T-Zell-Infiltration in Tumoren beteiligt ist [203,204].
Irf9	ist ein Transkriptionsfaktor, der die angeborene Immunantwort reguliert [205].
C3	kodiert für ein Komplementfaktor C3 und ist ein wichtiger Bestandteil bei der Aktivierung des Komplementsystems [206].
Qser1	(Glutamin- und Serin-reiches 1) ist ein DNA-Methylierungsmodulator, der eine Rolle bei der Tumortransformation und Immunsuppression spielt, insbesondere in der Tumor-Mikroumgebung [207].
Tmem74bos	modifiziert die Bildung von Autophagolysosomen und ist an der funktionellen Autophagie beteiligt, was unter Zellstressbedingungen von Bedeutung ist [208,209].
	In EE HFD herunterreguliert
Tnfrsf13b	kodiert für TACI, einen B-Zell-spezifischen Rezeptor der TNF-Rezeptor-Superfamilie, der eine entscheidende Rolle bei der Regulation und Funktion des Immunsystems, insbesondere der humoralen Immunität spielt [210].
Il17re	kodiert für den Interleukin-17-Rezeptor E, der IL-17C bindet. Studien zeigen, dass IL-17 Gewebeschädigung nach Schlaganfällen fördert und eine neurotoxische Rolle bei intrazerebralen Blutungen spielt [211,212].
Unc13d	(Unc13 Homolog D) ist ein Protein, das eine wichtige Rolle in der Exozytose von zytotoxischen Granula in Immunzellen spielt [213].

Tbl. 12: Hoch- und herunterregulierte Gene in der EE-Gruppe, die pro-apoptotische und pro-inflammatorische Signalwege sowie die Immunregulation betreffen.

Gene für anti-apoptotische Wege	
Gene	**Funktion**
	In EE HFD hochreguliert
Tox3	ist ein Transkriptionsfaktor, der die Entwicklung neuraler Stamm- und Vorläuferzellen reguliert und neuronale Zellen schützt, indem er anti-apoptotische Gene aktiviert und pro-apoptotische Gene unterdrückt [214,215].
Faim	(Fas Apoptotic Inhibitory Molecule-Like) kodiert für ein Protein, das eine wichtige Rolle beim Schutz von Nervenzellen vor dem programmierten Zelltod spielt. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Reduktion der Faim-L-Expression mit dem Fortschreiten der Neurodegeneration einhergeht, da sie die TNFα-vermittelte Entzündungsreaktion in Neuronen verändert [216].
Six3os1	ist ein Homeobox-Transkriptionsfaktor, das oxidative Stressreaktionen und neuronale Apoptose bei depressiven Mäusen reduziert [123,217].

Tbl. 13: Hoch- und herunterregulierte Gene in der EE-Gruppe, die an anti-apoptotischen Wege beteiligt sind.

Eine weitere wichtige Gruppe umfasst mitochondriale Gene, die durch EE hochreguliert sind.

Mitochondriale Gene	
Gene	**Funktion**
	In EE NCD hochreguliert
Cox7b2	kodiert für eine Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidas (COX) und spielt eine zentrale Rolle in der Zellatmung und Energieproduktion [138].

Tbl. 14: Hochregulierte Gene in der EE-Gruppe, die eine Rolle in der zellulären Energieproduktion spielen.

Es wurden ebenfalls Gene identifiziert, die direkt in die Blutgerinnung involviert und in CCNCD hochreguliert waren.

Gene für die Blutgerinnung	
Gene	**Funktion**
	In CC NCD hochreguliert (EE NCD herunterreguliert)
Apoh	ist ein Plasma-Proteinkomplex, der an der Regulation der intrinsischen Blutgerinnungskaskade durch Bindung an negativ geladene Phospholipide beteiligt ist [138].
F2	ist bekannt als Prothrombin und ist ein zentraler Bestandteil des Blutgerinnungssystems, der in Thrombin umgewandelt wird, um die Fibrinbildung und somit die Blutgerinnung zu unterstützen [138]. Neben dieser Funktion fördert Thrombin die Polarisation von Makrophagen zu einem entzündlichen M1-Phänotyp, was zu einer verstärkten entzündlichen Reaktion beiträgt [218].

Tbl. 15: Herunterregulierte Gene in der EE-Gruppe, die an der Blutgerinnung beteiligt sind. Wege beteiligt sind.

Stoffwechsel	
Gene	**Funktion**
	In EE NCD herunterreguliert
Bhmt	(Betain-Homocystein-Methyltransferase) ist ein wichtiges Enzym im Stoffwechsel von Homocystein, das zur Regulierung von Homocysteinspiegeln beiträgt [219].
Tmprss6	(Transmembrane Serine Protease 6) kodiert für ein Enzym, das den Eisenstoffwechsel durch Regulation von Hepcidin beeinflusst, wobei Störungen in diesem Prozess zu Eisenüberladung oder -mangel führen können [220].
	In CC NCD hochreguliert
Angptl3	kodiert für ein in der Leber produziertes Glykoprotein, das den Lipidstoffwechsel reguliert, indem es die Lipoproteinlipase (LPL) und die Endotheliale Lipase (EL) hemmt [221].
	In EE HFD hochreguliert
Amd2	(Adenosylmethionine Decarboxylase 1) ist ein Schlüssel-Enzym in der Biosynthese von Polyaminen [222].

Tbl. 16: Hoch- und herunterregulierte Gene in der EE-Gruppe, die zum Stoffwechsel beitragen.

Muskelfunktion-Genregulatoren/Muskelspezifische Gene	
Gene	**Funktion**
	In EE NCD herunterreguliert
Fbxl22	kodiert für ein zentrales Protein im Ubiquitinierungsprozess, das Muskelzellproteine wie Alpha-Actinin-2 und Filamin-C reguliert und dadurch die Muskelstruktur, -funktion und Muskelatrophie kontrolliert [223]. Eine Überexpression führt zu Muskelabbau, während eine Hemmung die Muskelmasse nach Denervierung schützt [224]. Zudem dient es als Immunbiomarker zur Vorhersage der Prognose bei Prostatakrebs [225].

Tbl. 17: Herunterregulierte Gene in der EE-Gruppe, die als Genregulatoren der Muskelfunktion fungieren.

Sonstige	
Gene	**Funktion**
	In EE NCD hochreguliert
4930426D05Rik	
Gm3488	
	In EE NCD herunterreguliert
Gm16091,Gm18939,Gm37240,Gm37821,Gm13684,Gm26280,Gm50241	gehören zu einer Gruppe von vorhersehbaren Genen, die nicht vollständig charakterisiert sind und die als "Gm" (Genmodell) bezeichnet werden [138].
Vmn1r49	kodiert für einen Rezeptor, der mit der Wahrnehmung von Pheromonen und anderen chemischen Signalen im Zusammenhang [138].
	In EE HFD herunterreguliert
Olfr1396	ist ein olfaktorischer Rezeptor, der für die Geruchswahrnehmung verantwortlich ist [138].
Gm15494	

Tbl. 18: Hoch- und herunterregulierte Gene in der EE-Gruppe, die keiner spezifischen Genkategorie zugeordnet werden können.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass in den EE-Gruppen Gene hochreguliert waren, die an neuronaler Reifung, synaptischen Prozessen sowie neuroimmunen Mechanismen beteiligt sind. Diese waren nicht überlappend in NCD und HFD. Dazu zählten Gene, die die synaptische Signalübertragung (*Cacna1-HFD, Kcnj4-HFD, Doc2a-HFD*), sowie die cholinerge (*Slc18a3-NCD, Slc5a7-NCD*), dopaminerge (*Drd1-HFD*) und

glutamaterge Prozesse (*Gsg1l-HFD*) regulieren. Darüber hinaus wurden Gene identifiziert, die für die neuronale Entwicklung (*Hoxc4-NCD, Fgf7-HFD, Ecel1-NCD*), die Differenzierung (*Barhl1-HFD*), das Axon- und Dendritenwachstum (*Prph-NCD, Thy1-HFD*) sowie die Regulation Synapsen (*Chodl-NCD, Camkv-HFD, Tafa-HFD, Lrfn2-HFD*) relevant sind. Ergänzend zeigten sich Genen, die an Zelladhäsion (*Vill-NCD, Hs3st3a1-NCD, Gm3488-NCD, Susd2-NCD, Pigp-NCD*) und an immunologischer Regulation (*Cd83-NCD*) beteiligt sind.

Gleichzeitig zeigten sich mehrere Gene in den EE-Gruppen herunterreguliert, die an neuronaler Entwicklung (*Mov10-NCD, Usp9x-NCD, Mllt3-NCD, Setd1a-HFD*), Zelladhäsion (*Itga5-HFD*), der extrazellulären Matrix (*Mfap3-NCD*) sowie der intrazellulären Signalübertragung (*Ppm1h-HFD*) eine Rolle spielen. Darüber hinaus wurden Gene mit Funktionen in der Myelinisierung (*Selenoi-NCD*), im Glukosestoffwechsel (*Gnpnat1-NCD*), in der DNA-Reparatur (*Rif1-NCD*) sowie in der Regulation des Zellzyklus (*Tox4-NCD*) vermindert exprimiert.

In den EE-Gruppen waren nur wenige Gene hochreguliert, die mit der Aktivierung des Immunsystems in Zusammenhang stehen, insbesondere die an der Immunaktivierung über das Komplementsystem (*Ighm-NCD*), an der T-Zell-Aktivierung (*Skap1-NCD*) sowie an tumorrelevanten Prozessen (*Galnt14-HFD*) beteiligt sind.

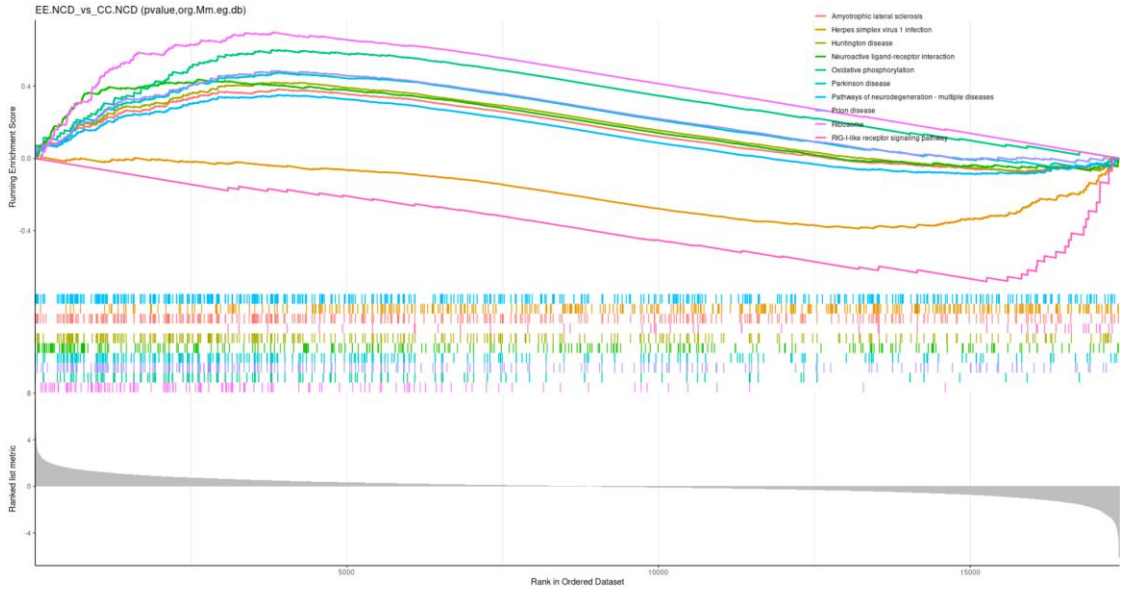
Demgegenüber zeigten die EE-Gruppen eine Herunterregulation mehrerer Gene, die apoptotische oder proinflammatorische Signalwege sowie immunologische Prozesse regulieren. Dazu gehörten Regulatoren von MAP-Kinasen (*Dusp1-NCD*), AP-1-Signalwegen (*Fos-NCD*) und T-Zell-Differenzierung (*Fosl2-NCD*). Ebenso waren Gene der angeborenen Immunität wie *Irf9 (NCD)* und *C3* (Komplementfaktor; *NCD*) vermindert exprimiert. Weitere herunter regulierte Gene betrafen Prozesse der Autophagie (*Tmem74bos-NCD*), der humoralen Immunregulation (*Tnfrsf13b-HFD*), der IL-17-Signalübertragung (*Il17re-HFD*) sowie der Freisetzung zytotoxischer Granula (*Unc13d-HFD*). Zudem zeigte die EE-Gruppe eine erhöhte Expression von Genen, die neuronale Apoptose reduzieren könnten (*Tox3-HFD, Faim-HFD, Six3os1-HFD*).

Alle signifikant veränderten mitochondrialen Gene wie *Cox7b2 (NCD)*, eine Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase (COX), waren in EE hochreguliert.

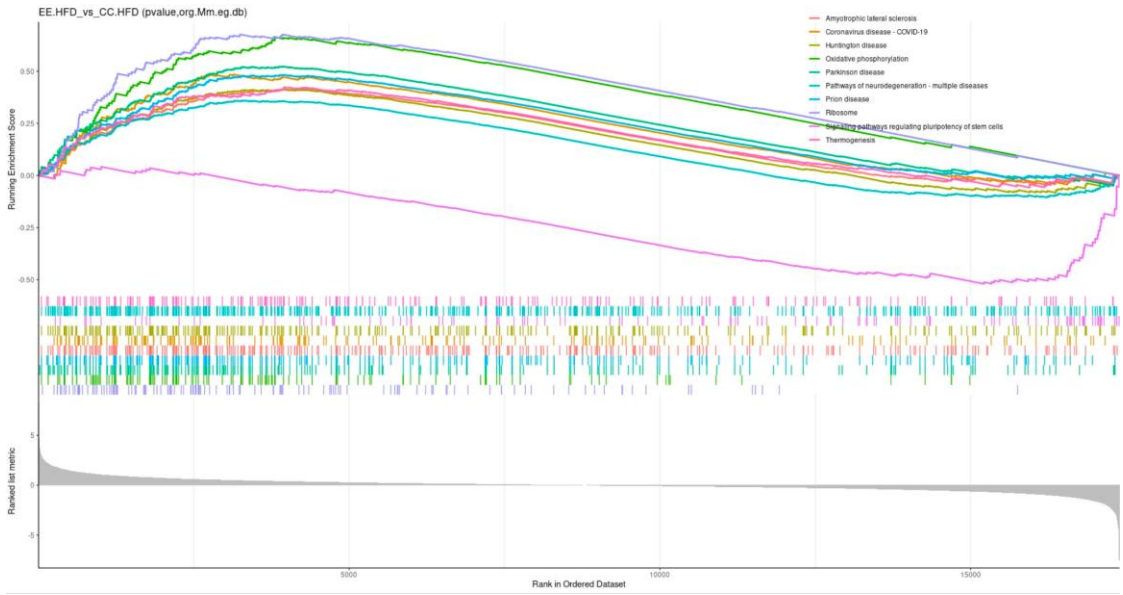
In den EE-Gruppen zeigte sich eine verminderte Expression mehrerer Stoffwechselgene. Dazu gehören Gene des Homocystein-Metabolismus (*Bhmt-NCD*) und des

Eisenstoffwechsels (*Tmprss6-NCD*) sowie *des* Lipid-Stoffwechsels (*Angptl3-NCD*). Auch Gene, die an der Blutgerinnung beteiligt sind, waren herunterreguliert, darunter *Apoh (NCD)*, die die intrinsische Gerinnungskaskade moduliert, sowie *F2* (Prothrombin; *NCD*), ein zentrales Gerinnungsprotein. Zudem zeigte die EE-Gruppe eine Herunterregulation muskelspezifischer Genregulatoren, darunter *Mybpc1 (HFD)*, Myosin-Bindungsprotein, sowie *Fbxl22 (NCD)*, ein Ubiquitinierungsprotein, dass die Stabilität struktureller Muskelproteine steuert.

4.7. KEGG-Pathway Analyse: EE beeinflusst maßgeblich Gene für oxidative Phosphorylierung und ribosomale Proteine

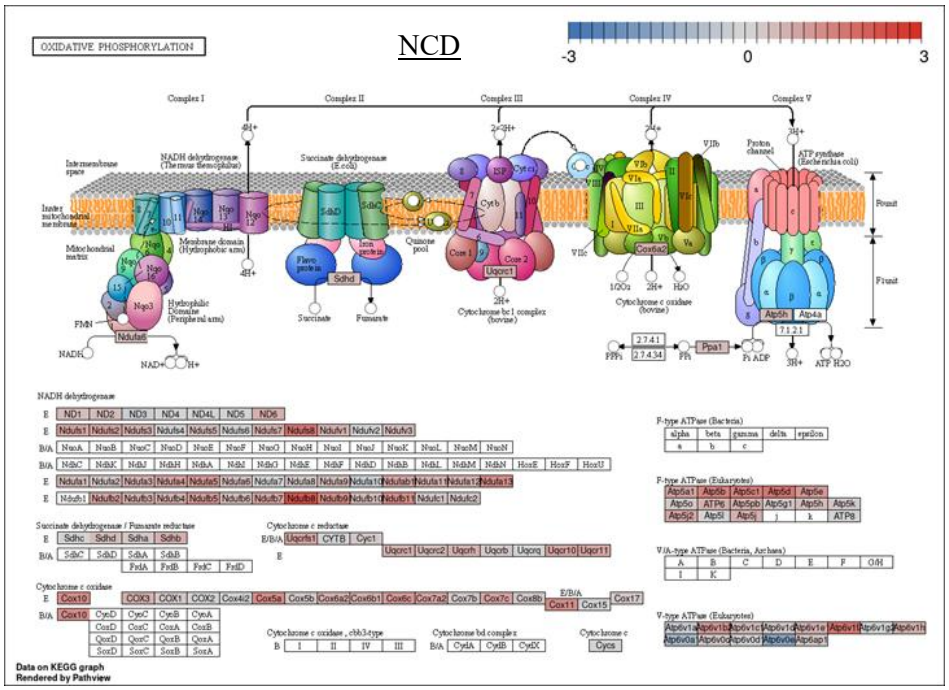


(A)

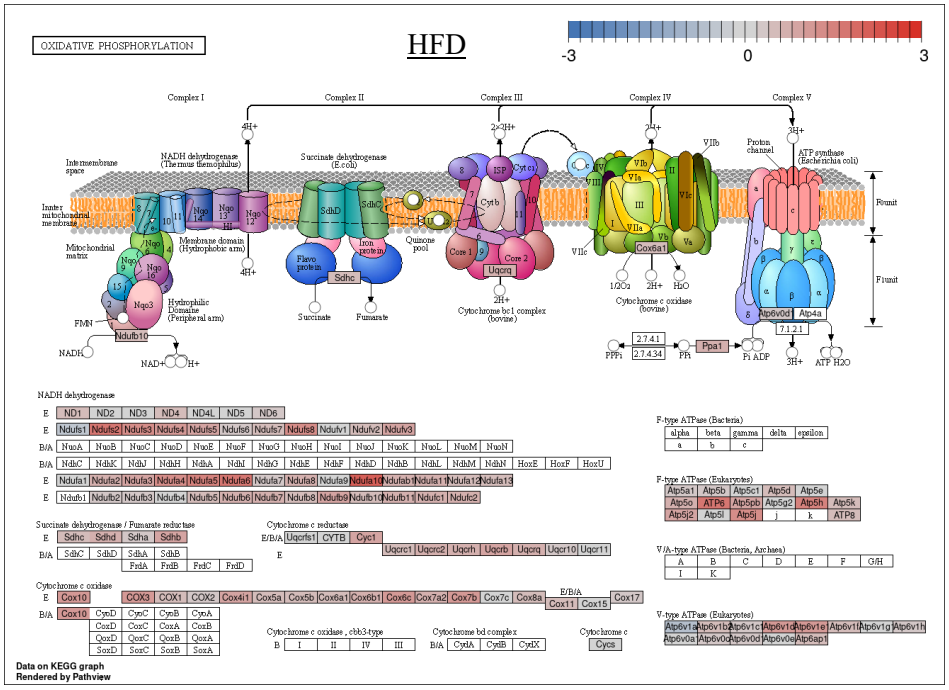


(B)

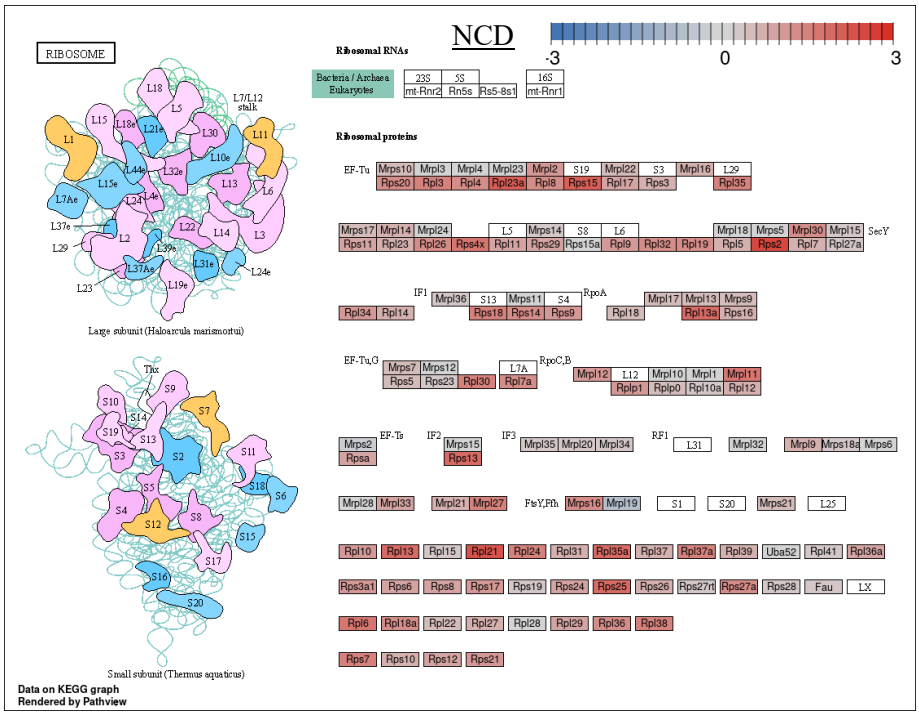
Abb. 18: Running Enrichment Score nach KEGG pathways (A) Gruppenvergleich von EE NCD vs CC NCD (B) EE HFD vs CC HFD


OXIDATIVE PHOSPHORYLATION
NCD
-3
0
3
Complex I
Complex II
Complex III
Complex IV
Complex V
Data on KEGG graph
Rendered by Pathview

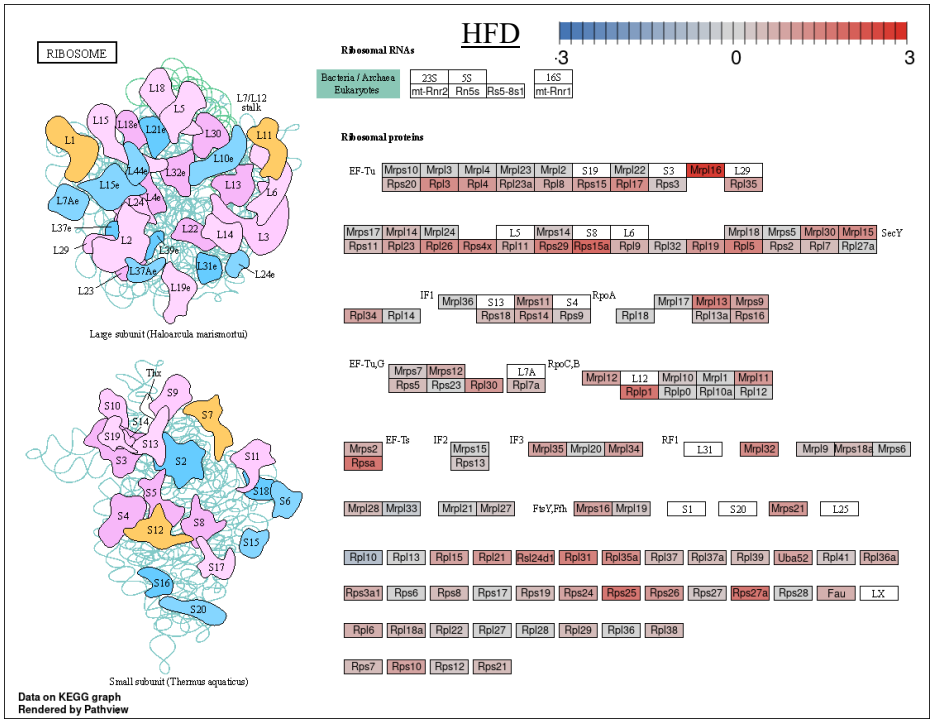
(A)


OXIDATIVE PHOSPHORYLATION
HFD
-3
0
3
Complex I
Complex II
Complex III
Complex IV
Complex V
Data on KEGG graph
Rendered by Pathview

(B)



(C)



(D)

Abb. 19: KEGG Pathway 00190 : Oxidative Phosphorylierung/ Atmungskette (A) Gruppenvergleich von EE NCD vs CC NCD (B) EE HFD vs CC HFD, KEGG Pathway 03010: Ribosom (C) EE NCD vs CC NCD (D) EE HFD vs CC HFD, Rot: Hochregulierte Gene, Blau: Herrunterregulierte Gene

Die KEGG-Pathway-Analyse zeigte, dass EE im Vergleich CC verschiedene Signalwege abhängig von der Diät beeinflusste. Beim Vergleich der EE NCD vs CC NCD Gruppe waren folgende Signalwege in absteigender Signifikanz beeinflusst: Ribosom (*KEGG Pathway 03010*), Oxidative Phosphorylierung (*00190*), Prionenkrankheit (*05020*), Parkinson-Krankheit (*05012*), Huntington-Krankheit (*05016*), Wechselwirkung zwischen neuroaktiven Liganden und Rezeptoren (*04080*), Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) (*05014*), Wege der Neurodegeneration - multiple Erkrankungen (*05022*) hochreguliert. Gleichzeitig zeigten sich die Pathways Herpes-simplex-Virus-1-Infektion (*05168*) und der RIG-I-ähnliche Rezeptor-Signalweg (*04622*) als herunterreguliert in EE (Abb. 18A).

Bei EE HFD waren im Vergleich zu CC HFD Gene in den Signalwegen Ribosom, Oxidative Phosphorylierung, Parkinson-Krankheit, Prionenerkrankung, Coronavirus-Krankheiten - COVID-19 (*05171*), Thermogenese (*04714*), ALS, Huntington-Krankheit sowie Wege der Neurodegeneration hochreguliert. Gleichzeitig war der Signalweg, der die Pluripotenz von Stammzellen (*04550*) reguliert, unter EE herunterreguliert (Abb. 18B). Hier sahen wir deutliche Überlappungen zwischen den unterschiedlichen Diätgruppen.

Die zwei am stärksten angereicherten Pathways in beiden Diätformen waren Oxidative Phosphorylation (Abb. 19A; B) und Ribosom (Abb. 19C; D) und sollen im Folgenden näher erläutert werden. Der erste umfasste die Komplexe der Atmungskette, welche sich aus fünf Teilen zusammensetzen. Der Datensatz umfasste insgesamt 186 Geneinträge, von denen 79 Gene in der EE NCD-Gruppe und 77 Gene in der EE HFD-Gruppe eine Hochregulierung aufwiesen. Es konnten nur wenige Gene identifiziert werden, die eine Herunterregulierung aufwiesen. Dazu gehörten *Atp6v0e* und *Atp6v0a1* in der NCD-Gruppe sowie *Atp6v1a* und *Ndufs1* in der HFD-Gruppe.

Im Komplex I, der NADH-Dehydrogenase, zeigten sich vor allem die Gene *Ndufs8* und *Ndufb8* in der NCD-Gruppe hochreguliert. In der HFD konnten wir ebenfalls eine Hochregulierung von *Ndufs8,* sowie *Ndufa10, Ndufa6 und Ndufs2* beobachten.

Im Komplex II, der Succinat-Dehydrogenase waren insbesondere *Sdhb* und *Sdha* in der NCD- Gruppe hochreguliert. In der HFD wurde zusätzlich eine Hochregulierung von *Shdc* identifiziert.

In Bezug auf Komplex Ⅲ, der Cytochrom-C-Reduktase, NCD, ließ sich feststellen, dass nahezu alle Gene hochreguliert waren, insbesondere *Uqcrfs1, Uqcr10* und *Uqcr11* in NCD und *Cyc1* und *Uqcrb* in HFD.

Im Komplex Ⅳ, der Cytochrom-C-Oxidase, wurden deutlich erhöhte Genexpressionswerte in NCD für *Cox10, Cox5a, Cox6c* und *Cox11* sowie in HFD ebenfalls für *Cox10, Cox6c*, aber auch *Cox7b, Cox4i1* und *COX3* nachgewiesen.

Im Komplex Ⅴ, der ATP-Synthase, wurden zahlreiche Gene des F-Typs hochreguliert. Hier waren in der NCD-Gruppe insbesondere *Atp5d, Atp5b, Atp5c1* und *Atp5e* hochreguliert. Die HFD führte zur Induktion der Expression von *Atp6,* gefolgt von *Atp5h* und *Atp5j.* Bei den V-Typ-Proteinen waren in der NCD-Gruppe *Atp6v1f* und *Atp6v1b2* zu beobachten, während in der HFD-Gruppe eine erhöhte Expression von *Atp6v1d* und *Atp6v1e1* festgestellt wurde.

Der zweite signifikant überrepräsentierte KEGG-Pfad umfasste eine Gruppe von 135 Geneinträgen (siehe Abb. 19C; D), die für kleine (Ribosomal Protein Small (RPS)) und große (Ribosomal Protein, Large (RPL)) ribosomale Kernproteine kodieren. Von diesen wiesen fast alle (*NCD: 98, HFD: 83*) in EE erhöhte Transkriptionswerte auf, mit Ausnahme von *Mrpl19* in NCD und *Rpl10* in HFD. In der Gruppe NCD ließ sich eine deutliche Hochregulierung der Gene *Rps2, Rpl23a, Rps15* und *Rpl21* beobachten. Zu den weiteren stark hochregulierten Genen zählten *Rps4x, Rpl13a, Mrpl11, Rps13, Rpl13, Rpl35a, Rsp25, Rpl6*, sowie *Rps7.* Im Gegensatz dazu konnten wir in der HFD-Gruppe eine Hochregulierung der Gene *Mrpl16, Rps15a, Rpsa, Rps25* und *Rps27a* beobachten.

Zusammenfassend zeigte die KEGG-Analyse, dass insbesondere Gene, die an der mitochondrialen Atmungskette und an ribosomalen Strukturproteinen beteiligt sind, durch EE hochreguliert waren - ungeachtet der Ernährungsform.

Vergleichs-gruppen	**Hochreguliert in EE**	**Runterreguliert in EE**
EE NCD vs. CC NCD	**Prionerkrankung**: *Prnp*, *Psma6*, mitochondriale Gene, axonaler Transport **Parkinson-Krankheit:** Ribosomale und mitochondriale Gene, weiterhin axonale Transportgene (*Tuba1b, Tubb3*), Proteasom (*Psma6*, *Psmd9*), *Cav1*, *C1qb* (Komplement), *Grin3a*	**Herpes-simplex-Virus 1 Infektion**: *Akt2, Casp8, Zfp874b, C3, Ikbkb, Rela, Birk2* **RIG-I-ähnlicher Rezeptor-Signalweg:** *Otud5, Sike1, Azi2, Ripk1, Ikbkb, Rela* **Neuroaktive Ligand-Rezeptor-Interaktionen:** *C3* (Anaphylatoxin), *F2*

	Huntington-Krankheit: Mitochondrial, axonaler Transport, Proteasom, *Clta*, *Dnal4*, *Gpx2* **Neuroaktive Ligand-Rezeptor-Interaktionen:** *Drd5* (Dopamin), *Hrh3* (Histamin), *Htr7* (Serotonin), *Apln* (Apelin), *Mc4r* (Melanocortin), *Ntsr1* (Neurotensin), *Oprk1* (Endomorphin), *Hcrtr1* (Orexin), *Sstr4* (Somatostatin), *Mchr1* (Hormonprotein), *Ptger4* (Prostaglandin2), *Calca* (Calcitonin), *Glp1r* (Glucagon-like Peptid), *Gabra5* (GABA), *P2rx5* (Nukleotide) **Amyotrophe Lateralsklerose:** Mitochondrial, axonaler Transport, Neurofilamente (*Prph*), *SOD1* **Pathways der Neurodegeneration**: Mitochondrial, Proteasom, axonaler Transport (*Tuba1b*, *Tubb3*, *Dnal4*, *Actr1a*), *Prph*, *Sqstm1*	(Proteinase-aktiviert) und *Nr3c1* (Cortisol)
EE HFD vs. CC HFD	**Parkinson-Krankheit:** Mitochondrial, axonaler Transport (*Kif5a*, *Tubb3*), Dopamin (*Drd2*, *Drd1*), *Ubb*, *Camk2a*, Proteasom (*Psma2*, *Sem1*) **Prionerkrankung**: Mitochondrial, *C1qp, Prnp*, *Ppp3r1*, *Casp3*, Proteasom (*Psma2*, *Sem1*), NADPH-Oxidase (*Rac2*) **Coronavirus-Krankheit – COVID-19**: Ribosom, *Irak4*, *Syk* **Thermogenese:** Mitochondrial, *Smarcd3*, *Hras*, *Prkacb* **Amyotrophe Lateralsklerose:** Mitochondrial, axonaler Transport (*Kif5a*, *Tubb3*, *Dctn5*, *Hap1*), *Pfn2*, *Gpx1*, *Ppp3r1*, *Sqstm1*, *Nup43* **Huntington-Krankheit:** Mitochondrial, axonaler Transport (*Kif5a*, *Tubb3*, *Dctn5*, *Hap1*), Proteasom (*Psma2*, *Sem1*), *Gpx1*, *Polr2e* **Pathways der Neurodegeneration**: Mitochondrial, Proteasom (*Psma2*, *Sem1*, *Ubb*, *Uba7*), *Grm5*, *Fas*, *Nox1*, *Camk2a*, *Cdk5*, *Gpx1*, axonaler Transport (*Kif5a*, *Tubb3*, *Dctn5*, *Hap1*)	**Signalwege, die die Pluripotenz von Stammzellen regulieren:** *Bmpr1a*, *Acvr1c*, *Fzd5*, *Pcgf5*, *Axin2* **Thermogenese:** *Lipe*, *Zfp516* **Amyotrophe Lateralsklerose:** *Ranbp2* **Pathways der Neurodegeneration**: *Fzd5*, *Lrp5*, *Axin2* (Wnt-Signalweg), *Kif5c*

Tbl. 19: Gruppenvergleich EE NCD vs CC NCD, EE HFD vs CC HFD

Auch die anderen Pathways zeigten in EE überwiegend hochregulierte Gene, die mit mitochondrialen und/oder ribosomalen Proteinen, aber auch axonalen Transportproteine und Neurotransmitter, sowie Proteasom Gene in Verbindung stehen (vgl. Tbl. 19).

Beispielsweise zeigte die EE-Gruppe im Vergleich zu CC eine deutliche Hochregulation von Genen, die spezifischen neurodegenerativen Signalwegen zugeordnet sind. Dazu gehörten *Prnp* (*NCD; HFD*) sowie die Proteasomkomponenten *Psma6 (NCD), Psma2 (HFD) und Sem1 (HFD)* innerhalb des Signalwegs der Prionerkrankungen. Ebenso waren im Parkinson-Signalweg axonale Transportgene wie *Kif5a (HFD), Tuba1b (NCD)* und *Tubb3 (NCD; HFD)* sowie dopaminerge Rezeptorgene (*Drd1-HFD, Drd2-HFD*) hochreguliert.

Zudem waren Gene, die für Rezeptoren kodieren, wie Dopamin (*Drd5*), Histamin (*Hrh3*), Glutamat (*Grin3a)*, Serotonin (*Htr7*), GABA (*Gabra5*), Neurotensin (*Ntsr1*), aber auch Apelin (*Apln*) im Signalweg der neuroaktiven Liganden-Rezeptor-Interaktion, in EE NCD hochreguliert. Gleichzeitig zeigte CC NCD eine Herunterregulation immunmodulatorischer Gene, darunter *C3* (Komplement), *F2* (Proteinase-aktiviert) und *Nr3c1* (Cortisolrezeptor).

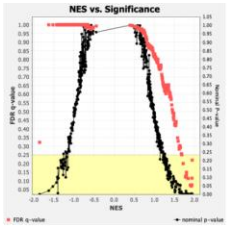
Auch Gene, die für Neurofilamente kodieren (*Prph*), waren in der EE NCD sowohl im ALS - als auch Neurodegeneration Signalweg erhöht. Zudem waren Gene für den axonalen Transport (*Kif5a (HFD), Tubb3 (NCD; HFD), Dctn5 (HFD), Hap1 (HFD)*) in den Signalwegen der ALS, Neurodegeneration und Huntington-Krankheit hochreguliert.

In der CC NCD-Gruppe waren Gene, die für Komponenten der immunologischen Antwort kodieren, in dem HSV-1-Infektion- und dem RIG-I-ähnlichen Rezeptor-Signalweg herunterreguliert. Darunter waren Mediatoren der Apoptose und Inflammation (*Casp8, Akt2, Birk2*), der Komplementaktivierung (*C3*), sowie des NF-κB-Signalwegs (*Ikbkb, Rela*).

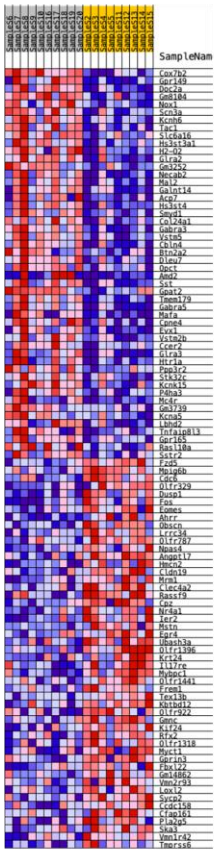
Ergänzend zeigte die CC HFD-Gruppe eine Herunterregulation von Genen, die sowohl der Thermogenese (*Smarcd3, Hras, Prkacb*) als auch der Regulation der Stammzell-Pluripotenz (*Bmpr1a, Acvr1c, Fzd5, Pcgf5, Axin2)* zugeordnet sind.

4.8. GSEA-Analyse: Enrichment für ribosomale Gene unter EE

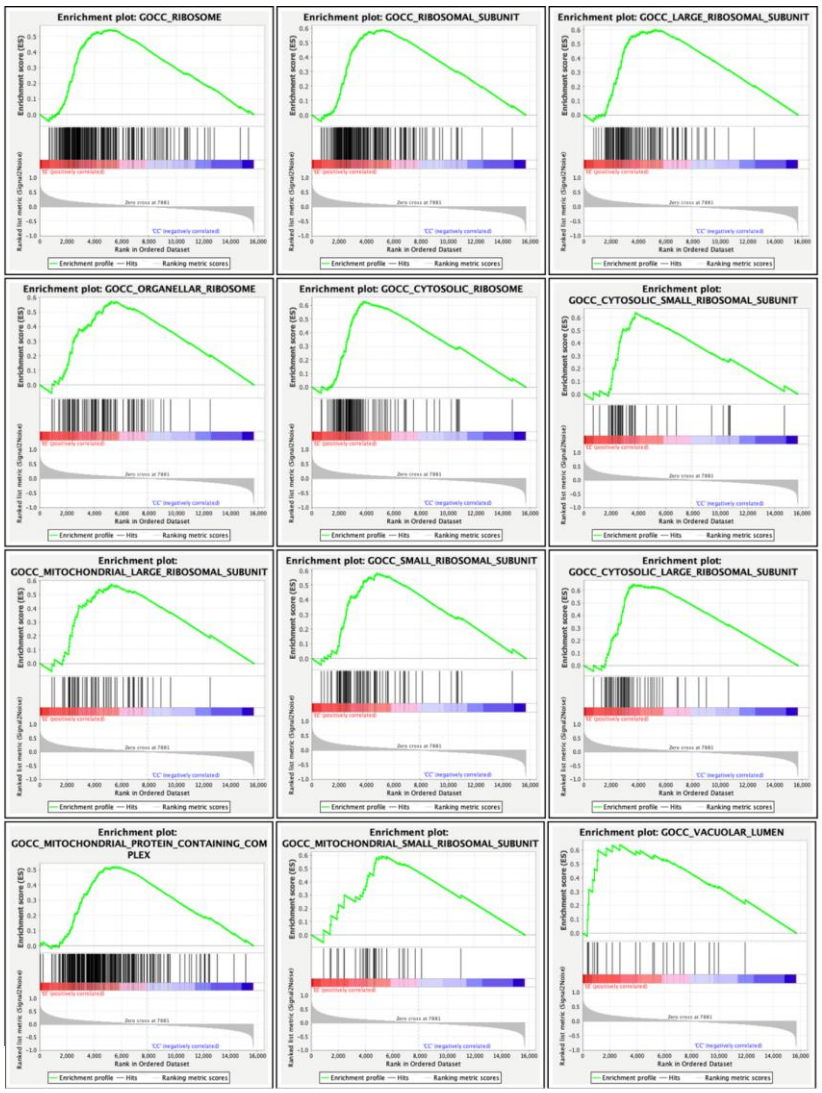
(A)

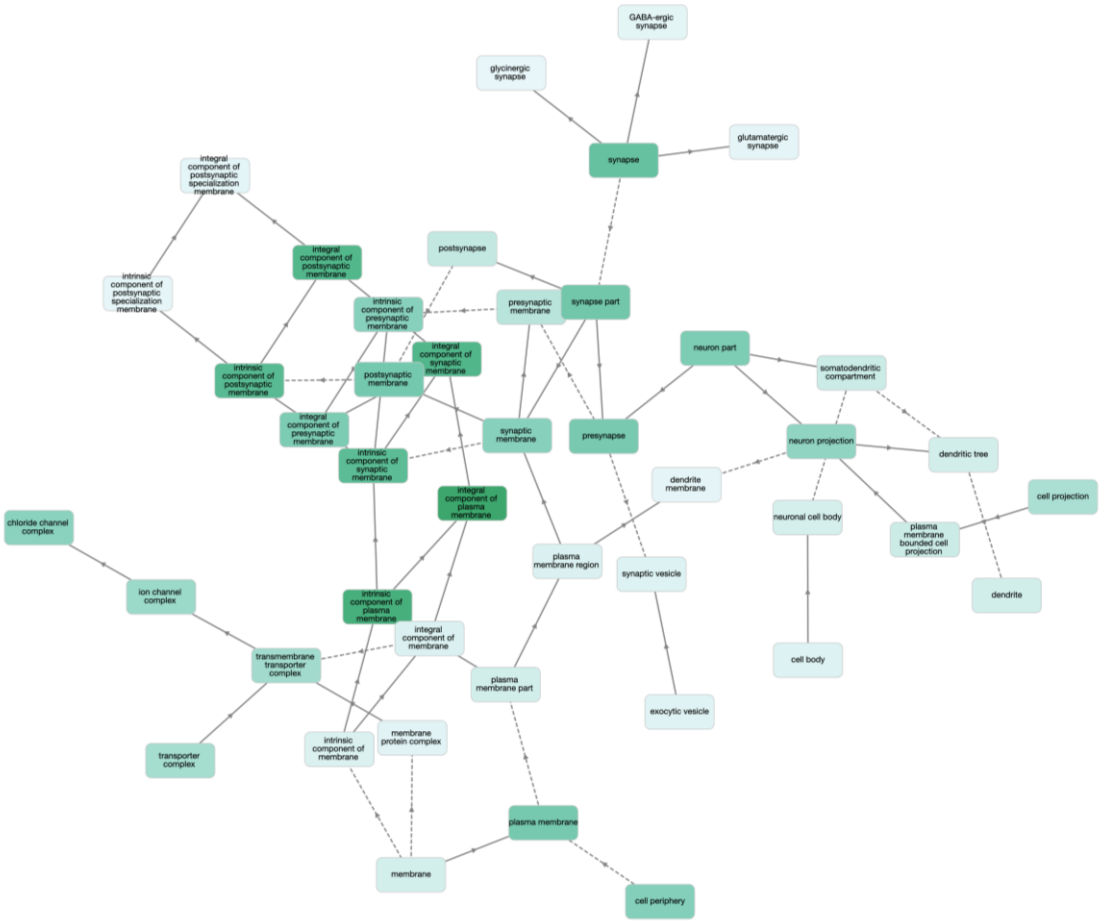


(B)



(C)





(D)

Abb. 20: GSEA-GOCC Analyse: ribosomale und mitochondriale Gene sind angereichert in EE

A) Graph zeigt den Normalized Enrichment Score (NES) der Gen-Sets in Abhängigkeit der Signifikanz (p-Wert) und FDR q-value. Es zeigten sich ausschließlich positiv signifikant angereicherte Gen-Sets für die EE-Intervention, keine negativen (für CC). B) Heatmap zeigt die 50 am stärksten in EE positiv (rot) und negativ (blau) angereicherten Gene der Proben EE (grau) vs. CC (gelb) C) die 12 signifikantesten GSEA Enrichment Plots für die GOCC (Gene Ontology Cellular Compartment) Datenbank, die ein positives Enrichment bei EE-Intervention darstellen zeigen v.a. Anreicherungen in ribosomalen und mitochondrialen Strukturen D) Netzwerk-GOCC-Analyse der Gene mit einem Enrichment Score >0,6 (n = 98) zeigt, dass die angereicherten Gene an der Expression neuronaler Strukturen (Dendriten, Axonen, Synpapsen) beteiligt sind (je intensive die Grünfärbung, umso mehr Gene befinden sich im Cluster)

Weiterhin führten wir eine Gene-Set Enrichment-Analyse (GSEA) durch. Hier wurden nicht die Einzelgruppen, sondern alle CC- mit allen EE-Tieren verglichen, um den EE-Effekt unabhängig von der Ernährung zu analysieren. Im Rahmen der EE-Intervention konnten ausschließlich positiv signifikant angereicherte Gen-Sets festgestellt werden *(*p<0,225*)*. Demgegenüber waren negativ korrelierte Gene in keinem Kompartment oder Kategorie

signifikant angereichert (Abb. 20A). Die Analyse ergab eine Anreicherung von Genen durch EE in ribosomalen und mitochondrialen Gen-Sets aus der Gene Ontology Cellular Compartment Datenbank (Abb. 20C) und bestätigte die Ergebnisse der KEGG-Analyse. Interessanterweise fanden sich in der Netzwerkanalyse der Gene mit einem Enrichment Score von >0,6 (n = 98), Gen-Cluster, die am Aufbau von Synapsen, Dendriten und Axonen, demnach insgesamt an der Struktur und Funktion von Neuronen beteiligt sind (Abb. 20D). Dies bestätigte wiederum die manuelle Cluster-Analyse (Tbl. 11).

Die Heatmap (Abb. 20B) zeigte die 50 am stärksten in EE positiv bzw. negativ angereicherten Gene. Die in EE hochregulierten Gene standen im Zusammenhang mit biologischen Prozessen wie neuronaler Plastizität, synaptischer Funktion, zellulärer Signaltransduktion sowie metabolischer Aktivität (siehe Abb. 20B). Hierzu zählten unter anderem Ionenkanäle sowie Neurotransmitterrezeptoren wie *Scn3a, Slc6a16, Kcnh6, Kcna5, Kcnk15, Gabra3, Gabra5, Glra2, Glra3, Htr1a, Gpr149* und *Gpr165*. Darüber hinaus waren Gene beteiligt, die neuropeptiderge Signalwege repräsentieren, wie *Tac1* und *Sst*, sowie Gene mit Funktionen in der synaptischen Organisation (*Cbln4*) und der neuronalen Struktur und Modulation (*Vstm5, Vstm2b*). Weitere hochregulierte Gene waren der posttranslationalen Proteinmodifikation (*Galnt14)* und der extrazellulären Matrix (*Hs3st3a1, Hs3st4, Col24a1, P4ha3 und Opct*) zuzuordnen. Zu den Genen der zellulären Signaltransduktion zählte *Tmem179* und der calciumabhängigen Prozesse zählten *Necab2*, *Cpne4*, *Ppp3r2* und *Stk32c*. Darüber hinaus waren Gene mit metabolischen (*Gpat2, Amd2, Mafa, Acp7, Smyd1*) und mit mitochondrialen Funktionen (*Cox7b2*) vertreten. Ergänzend wurden weitere Gene identifiziert, die in EE hochreguliert sind und die die Regulation von Appetit und Sättigung steuern (*Mc4r*), sowie Gene, die mit der Immunmodulation in Verbindung stehen (*Btn2a2, Dleu7, Tnfaip8l3*), und Gene, die oxidativen Stress regulieren (*Nox1*).

Die in EE herunterregulierten Gene befanden sich Transkriptionsfaktoren wie Immediate Early Gene *Fos, Dusp1, Ier2, Nr4a1, Npas4, Egr4,* die unter anderem an der Regulation von Stressantworten beteiligt sind *(Fos, Dusp1, Nr4a1),* sowie weitere regulatorische Gene wie *Ahrr*, *Rassf9*, *Ubash3a*, *Myct1* und der Wnt-Rezeptor *Fzd5.* Zudem waren Gene der Zellzyklus- und Proliferationskontrolle (*Cdc6, Ska3, Kif24, Rfx2*) sowie der extrazellulären Matrix- und Strukturorganisation (*Obscn, Hmcn2, Frem1, Loxl2, Lrrc34, Krt24, Mybpc1*) vermindert exprimiert. Ergänzend zeigten sich Herunterregulationen von Genen, die mit neuronaler Entwicklung und Differenzierung assoziiert sind, darunter *Eomes*, *Gmx*, *Gprin3* und *Angptl7*. Außerdem zeigten sich Herunterregulationen von immun- und entzündungsassoziierten Genen (*Clec4a2, Il17re, Pla2g5, Mpig6b, Nr4a1*) sowie zahlreicher olfaktorischer Gene *Olfr329, Olfr787, Olfr1396, Olfr1441, Olfr922, Olfr1318*.

In die Netzwerk-GOCC-Analyse wurden alle Gene eingespeist, welche einen positiven Enrichment Score (>0,6, Abb. 20B) aufwiesen. Diese wurden nach der Gene Ontology Datenbank in Cellular Compartments eingeteilt. Hier zeigten sich besonders die Compartments: “Integral Component of Synaptic membrane”, “Intrinsic component of Postsynaptic membrane”, “Integral component of Plasma membrane”, “Synapse part”, “Neuron part”, “Transmembran transporter complex” hervorgehoben. Die angereicherten Gene waren demnach insbesondere im Bereich der Synapsen, Dendriten und axonalen Strukturen zu finden.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von Enriched Environment und einem aktiven Lebensstil auf das Gehirn und spezifisch auf die klinische Erholung und die Genexpression im Kleinhirn nach Schlaganfall untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass 1) EE die klinische Erholung und Funktion maßgeblich beeinflusst. 2) EE einen lokalen Einfluss auf die Entzündungsreaktion im Infarkt hat und den neuronalen Untergang im Periinfarktgewebe reduziert und 3) mechanistisch für die positiven Effekte EE Tiere eine erhöhte Expression von strukturell neuronalen, anti-apoptotischen, mitochondrialen und ribosomalen Genen (im Kleinhirn) aufweisen.

5.1. Methodische Limitationen des Modells

EE als doppelte Intervention vor und nach Schlaganfall

Die vorliegende Studie erfasste die funktionelle Erholung über einen Zeitraum von 16 Tagen. Eine längere Beobachtungszeit könnte jedoch dazu beitragen, langfristige Auswirkungen der Umweltanreicherung und Ernährung auf die Erholung zu dokumentieren und zu bewerten, wie nachhaltig die beobachteten Ergebnisse sind. Die Ergebnisse dieser zeigten, dass die Versuchstiere der EE NCD-Gruppe bereits am ersten Tag einen deutlich höheren Score erzielten und diesen Unterschied auch beibehielten. Es ist jedoch wichtig zu berücksichtigen, dass hier sowohl eine Vorbehandlung mit EE wie auch eine Rehabilitation nach Schlaganfall stattfand. Dies sollte im Modell einen lebenslang gesunden Lebensstil widerspiegeln, lässt aber keine Schlüsse auf die individuellen Effekte von EE vor versus nach Schlaganfall zu. Vor Beginn der Studie wurde bei allen Tieren eine neurologische Untersuchung durchgeführt, um sicherzustellen, dass sie den gleichen Ausgangszustand aufweisen. Es wurde zudem sichergestellt, dass alle Tiere über die Fähigkeit zur Bewältigung des Gridwalks sowie eine allgemeine motorische Leistungsfähigkeit verfügen. Von der Studie ausgeschlossen wurden Tiere, die bereits vor Beginn der Studie Defizite aufwiesen. Dieser Test ist jedoch nicht dafür ausgelegt, einen bereits vor dem Schlaganfall bestehenden besseren Trainingszustand der Tiere im EE zu erfassen, sondern wurde spezifisch für neurologische Defizite nach Schlaganfall entwickelt. Aus dem bereits an Tag 1 nach PT bestehenden besseren klinischen Score der EE-Gruppen im Vergleich zu CC lässt sich ableiten, dass dieser Unterschied nicht an einer besseren Heilung liegen kann, da diese erst später einsetzt.

Messung der Nahrungsaufnahme nach Schlaganfall

Eine detaillierte Analyse der Nahrungsaufnahme nach Schlaganfall könnte durch den Einsatz spezifischer Messmethoden, wie beispielsweise der Verwendung von Fütterungskontrollsystemen im Phenomaster, durchgeführt werden. Die Anwendung solcher Messmethoden könnte detailliertere Informationen über die tatsächlich aufgenommene Nahrung liefern und somit die Frage klären, ob die verminderte Gewichtszunahme bei erhöhtem Energieverbrauch durch eine geringere Nahrungsaufnahme oder durch eine verstärkte Energieverwertung aufgrund der erhöhten Aktivität bedingt ist.

Fehlende hemisphärenspezifische Analyse des Kleinhirns

In der vorliegenden Arbeit wurde das Kleinhirn nicht seitengetrennt analysiert. Das Kleinhirn wurde entnommen und ausgewertet, ohne zwischen der kontra- und ipsilateralen Seite in Bezug auf die kortikale Läsion zu differenzieren. Da diaschitische Mechanismen insbesondere die kontralaterale Kleinhirnhemisphäre betreffen können, hätte eine seitengetrennte Analyse zusätzliche Einblicke in lateralisierte Anpassungsprozesse ermöglicht. Durch die Analyse des nahezu gesamten Kleinhirngewebes könnten regional begrenzte molekulare Veränderungen abgeschwächt oder überlagert worden sein

Zukünftige Arbeiten sollten daher eine seitengetrennte Probenentnahme und Analyse berücksichtigen, um Ferneffekte nach einem kortikalen Schlaganfall differenzierter erfassen zu können.

Limitationen der Transkriptomics

Aufgrund der geringen Anzahl an Tieren in der Transkriptomanalyse (n = 5) wurde bei der weiteren Analyse der Fokus auf Gene gelegt, die zwar eine geringere Log-Fold-Change aufweisen, jedoch statistisch signifikante Veränderungen (mit entsprechend niedrigen P-Werten) zeigen. Dies war insbesondere relevant, da wir bei der Umweltanreicherung und den Ernährungsumstellungen keine extremen Log-Fold-Changes erwarteten. Um diese weniger auffällige, aber möglicherweise biologisch relevanten Veränderungen besser erfassen zu können, wurde eine detaillierte Auswertung der Daten in Tabellenform durchgeführt. Auf diese Weise war es möglich, Gene zu identifizieren, die trotz kleinerer Veränderungen eine signifikante Reaktion auf die Umweltbedingungen und Diäten aufwiesen.

Der Sample Distance Plot zeigt, dass Probe 1 (S1) als deutlicher Ausreißer identifiziert wurde, da sie eine signifikant größere Distanz zu den anderen Proben aufwies. Der

Ausreißer in Probe 1 (S1) könnte auf einen technischen Fehler zurückzuführen sein, da das Gehirn von einem anderen Präparator entnommen wurde, was möglicherweise zu unterschiedlichen Genexpressionsprofilen geführt hat. Aus diesem Grund wurde Probe 1 von den weiteren Berechnungen ausgeschlossen, um die Verzerrung der Analyse zu minimieren.

Zudem ist die RNA-Expression nicht direkt umsetzbar in synthetisierte Proteine. Daher habe ich am Ende meiner Laborarbeit versucht per Western Blot ausgesuchte Proteine (z.B. *Cox7b2, Peripherin*) nachzuweisen. Ich habe mit zwei unterschiedlichen Methoden die Proteine isoliert. Leider waren die Ergebnisse bis zuletzt technisch bedingt nicht gut auswertbar, sodass wir bei der Auswertung meiner Arbeit auf den Western Blot verzichten mussten. Eine ergänzende Analyse auf Proteinebene wäre nichtsdestotrotz sinnvoll, um die biologische Wertigkeit der RNA-Ergebnisse zu überprüfen.

5.2. Gewichtsreduktion nach Schlaganfall: Ursachen und Konsequenzen

Am ersten Tag nach Schlaganfall verloren alle Tiere zunächst an Körpergewicht. In den NCD-Gruppen blieb die Phase des Gewichtsverlustes kurz, sodass die Tiere bis zum 7. Tag wieder ihr Ausgangsgewicht erreicht hatten. Im Gegensatz dazu erreichte die EE HFD Gruppe ihr Ausgangsgewicht erst im Durchschnitt am 16. Tag nach dem Schlaganfall. In der CC HFD-Gruppe konnte hingegen ein länger andauernder Gewichtsverlust und eine langsamere Erholung des Gewichts über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg beobachtet werden, sodass die Tiere der Gruppe an Tag 16 noch durchschnittlich 5% weniger wogen als vor Schlaganfall.

Der Gewichtsverlust nach Schlaganfall ist ein in Nagetiermodellen gut charakterisiertes Phänomen. Der Schlaganfall löst eine Reihe kataboler Veränderungen aus. Dazu gehören vor allem eine stressbedingte, neuroendokrine Aktivierung des autonomen Nervensystems über die adrenale Kortikosteroidsekretion [226], die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, eine erhöhte Belastung durch freie Sauerstoffradikale sowie systemische hormonelle Dysbalancen, die insgesamt eine katabole Dominanz begünstigen [227]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass durch Unterbrechung der adrenergen Achse die Mortalität deutlich ansteigt [226]. Somit erscheint der initiale Gewichtsverlust, getriggert durch die systemische Stressreaktion, überlebensnotwendig.

Weiterhin finden metabolische Umstellungen im Fett-, Leber- und Muskelgewebe statt. Haley und Kollegen beschreiben erhöhte freie Fettsäuren und Triglyceride im Plasma auch

60 Tage nach Schlaganfall [228]. Dies könnte auf die Freisetzung entzündungsfördernder Mediatoren zurückzuführen sein, die einen katabolen Stoffwechselzustand begünstigen [229].

Weitere sekundäre katabole Faktoren sind die durch Lähmungen und verminderte körperliche Aktivität bis hin zur Immobilität bedingten Veränderungen im Muskelgewebe (Sarkopenie) und Denervierung zu erklären [227]. Die Sarkopenie nach einem Schlaganfall wird vor allem auf die Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) sowie von Autophagie- und Apoptosemechanismen, zurückgeführt. Ebenso zeigen die Herunterregulation des AKT/mTOR Signalpfades sowie erhöhe Myostatin-Werte (Inhibitor des Skelettmuskelwachstums) im Muskelgewebe der betroffenen und der gegenseitigen Muskeln, welche im Muskelaufbau involviert sind, einen Beitrag zum nach Schlaganfall beobachteten Muskelabbau [230].

Längere Inaktivität und Hyperkortisolämie verstärken den Muskel- und Kraftabbau durch eine anhaltend reduzierte Muskelproteinsynthese [231]. Dem beschriebenen Mechanismus der Muskelatrophie kann insbesondere durch körperliche Aktivität entgegengewirkt werden, wobei die Studienlage zu Art, Dauer und Höhe der Belastung noch nicht sehr eindeutig ist [232]. Feng und Kollegen untersuchten die Auswirkungen von Krafttraining der gesunden Seite auf die Erholung nach Schlaganfall und fanden positive Auswirkungen auf Sarkopenie, Funktionalität und Stimmung [233].

Eine gestörte Nahrungsaufnahme oder erhöhter Grundumsatz sind laut Springer et al. nicht Ursache der Gewichtsabnahme, eher entgegengesetzt zeigt sich ein reduzierter Energieumsatz bei normaler Nahrungsaufnahme und Bewegung als kompensatorische Mechanismen [234]. Allerdings konnte eine weitere Gruppe zeigen, dass Nahrungsunterstützung die Mortalität senken und die Gewichtszunahme unterstützen kann, indem sie Hypoglykämie, Ketonämie und Dehydratation verhindert [235].

In der vorliegenden Studie zeigten die HFD-Gruppen eine langsame Erholung von dem Gewichtsverlust. Haley und Kollegen zeigten in mehreren Studien, dass Fettleibigkeit die metabolische Reaktion auf einen Schlaganfall verändert. Adipöse Mäuse zeigten über längere Zeiträume intramuskuläre Fetteinlagerungen sowie katabole Prozesse mit erhöhter Lipolyse und Inflammation, die den Krankheitsverlauf verlängern und die Erholung verzögern [228,236].

Die EE-Tiere mit HFD konnten allerdings deutlich schneller zu ihrem Ausgangsgewicht zurückkehren als die sedative Gruppe. Körperliches Training moduliert dabei katabole und anabole Signalwege. So konnte gezeigt werden, dass Training bei gealterten Ratten (ohne Schlaganfall) anabole Prozesse fördert und gleichzeitig katabole sowie apoptotische

Mechanismen in der Skelettmuskulatur abgeschwächter zurückkehren als bei der sedativen Gruppe [237]. Ergänzend wurde beschrieben, dass Ausdauertraining die katabolen Effekte von TNF-α in der Skelettmuskulatur von Mäusen abschwächt. Trainierte Tiere wiesen geringere Anstiege kataboler Marker (z. B. TNF-Rezeptoren, Forkhead Box O1 (FoxO1), Muscle RING Finger 1 (MURF1), Myostatin) sowie eine verminderte Autophagie-Induktion (z. B. Microtubule-associated protein 1 light chain (LC)3BII/LC3BI) auf [238].

Auch eine Präkonditionierung durch Sport kann die Post-Stroke Gewichtsabnahme durch eine Verbesserung der metabolischen Anpassungsfähigkeit verbessern [239]. Er steigert die Insulinsensitivität und fördert die Expression des Glukosetransporters (GLUT) 4 auf den Muskeln, wodurch die Glukoseaufnahme und -verwertung effizienter ablaufen sowie zu einer verbesserten Glukosetoleranz führt [240]. Diese Effekte tragen wahrscheinlich dazu bei, dass trainierte Tiere nach einem Schlaganfall schneller wieder an Gewicht zunehmen. Auch Training nach Schlaganfall kann möglicherweise die Gewichtsabnahme positiv beeinflussen, wie von Ogawa et al. gezeigt wurde [241].

5.3. Funktionelle Erholung durch EE-Intervention nach Schlaganfall

Die EE-Tiere lebten vor wie auch nach dem Schlaganfall in der EE-Umgebung. Dementsprechend betrachten wir ein zweifaches Modell aus Training (Präkonditionierung) vor dem Schlaganfall sowie Rehabilitation danach. Wir sahen insbesondere in den EE NCD Tieren dauerhaft bessere klinische Scores als in allen anderen Gruppen. Dieser Abstand zeigte sich unmittelbar nach Schlaganfall und hielt über die Beobachtungsdauer stetig an. Auch die EE HFD Tiere zeigten sich im Verlauf deutlich besser als die Vergleichsgruppe (CC HFD). Im Folgenden wurden die möglichen Einflussfaktoren auf diese Entwicklung eruiert.

a) Präkonditionierung mittels EE vor Schlaganfall

Vor Schlaganfall liefen alle Tiere nach mehrfachem Training in gleichem Maße den GridWalk hoch und zeigten kein neurologisches Defizit (Ergebnisse nicht dargestellt). Dies war die Voraussetzung für den Beginn der Studie. Allerdings zeigte die EE NCD Gruppe bereits am ersten Tag nach der PT die besten Ergebnisse im Neuroscore. Das sprach nicht (nur) für eine schnelle Heilung, sondern für die effektive Nutzung von Kompensationsmechanismen. Eine Studie von Risedal zeigte, dass präischämische körperliche Aktivität das Infarktvolumen um 42,2 %, während postischämische körperliche Aktivität um 18,9 % verringerte [242]. Eine weitere Studie berichtete hingegen, dass EE mit

einer etwa 8 % größeren Infarktgröße assoziiert war, jedoch gleichzeitig eine signifikante Verbesserung des funktionellen Outcomes bewirkte [243]. Diese Befunde verdeutlichen, dass funktionelle Erholung nicht ausschließlich vom Ausmaß struktureller Schädigung abhängt, sondern durch kompensatorische Netzwerkmechanismen beeinflusst wird. Die EE-Umgebung mit der Trainingskomponente scheint somit den Ausgangszustand, die "Brain Reserve", so zu verbessern, dass ein Ausfall von Teilen des Gehirns besser zu kompensieren war als bei den Gruppen ohne Sport. Welche Prozesse dieser erhöhten funktionellen Reserve zugrunde lagen, wurde in unserer Arbeit nicht direkt auf funktioneller Ebene quantifiziert. In unseren Transkriptomanalysen zeigten sich unter EE-Veränderungen in Signalwegen, die mit einer Modulation inflammatorischer Prozesse sowie mit einer verstärkten mitochondrialen Funktion und energiestoffwechselassoziierten Mechanismen vereinbar sind. Unsere Befunde passen zu dem in der Literatur beschriebenen Prinzip, dass die erhöhte Reservekapazität durch Aktivierung verschiedener neuroprotektiver Mechanismen (Neurogenese, Angiogenese, Schutz der BHS, Entzündungsmodulation und der Hemmung glutamaterger Überaktivität sowie apoptotischer Prozesse) entsteht [244,245].

b) EE zur Rehabilitation nach Schlaganfall

Nach abgelaufenem Schlaganfall ist die Rehabilitation eine gängige Therapie, die auf der Stroke Unit bereits früh eingesetzt wird, um die Erholung zu fördern. In unserem Modell wurden die EE-Tiere direkt nach Schlaganfall wieder in ihre gewohnte Umgebung mit den Laufrädern und anderen Bewegungs- und Erkundungsmöglichkeiten zurückgesetzt. Die EE-Gruppen blieben während der gesamten Messphase stetig besser als ihre Vergleichsgruppen, wobei die Geschwindigkeit der Erholung nicht über den anderen Gruppen lag (Abb. 16). Mechanismen wie die Vermeidung einer Inaktivitäts-induzierten Sarkopenie, psychosoziale Effekte von EE auf die Rehabilitation sowie die Förderung der neuronalen Plastizität nach Schlaganfall können nach stattgegebenem Schlaganfall durch EE und physikalische Aktivität zu einer besseren Erholung beitragen.

Sarkopenie ist häufig bei Schlaganfall-Überlebenden. Sie tritt in ca. 46% der Fälle langfristig ein [246]. Sarkopenie ist zudem stark assoziiert mit einer erhöhten Sturzrate, Hospitalisierungen, Mortalität, Frakturen, kognitiven Einschränkungen und eingeschränkter Lebensqualität [247,248]. Sarkopenie zu vermeiden, ist demnach eines der wichtigsten langfristigen Ziele der Schlaganfallrehabilitation. Zahlreiche Veröffentlichungen der letzten Jahre konnten nachweisen, dass Sarkopenie durch gezieltes Krafttraining (ggf. auch der nicht betroffenen Extremität) vermeidbar bzw. verbesserbar ist [247–249].

Auch psychische Faktoren können die Erholung nach Schlaganfall beeinflussen. Die Studie von Lima et al. konnte zeigen, dass EE die Symptome von Verhaltensstörungen wie z.B. Angst lindern kann. Eine Verringerung von Angst und Stress führt zu einer Verbesserung der kognitiven Leistung und des Verhaltens der Tiere, da sie sich besser auf Aufgaben wie räumliches Lernen und Objekterkennung konzentrieren können. Dies kann ebenso die Rehabilitation fördern [250]. Auch im Open Field Test in unserer Studie konnten wir eine durch EE gestärkte Exploration und verminderte Angstreaktion zeigen (Ladwig et al. in Revision). Auf den Menschen übertragen kann eine Post-Stroke Depression zu einem funktionell schlechteren Outcome führen mit vermehrten Einschränkungen in der Lebensqualität und Alltagstätigkeiten einhergehen [251]. Auch hier konnte wieder in multiplen Metaanalysen gezeigt werden, dass Sport und Bewegung die Post-Stroke Depression signifikant verbessern kann. Hier scheint insbesondere Ausdauersport eine wichtige Rolle zu spielen [252].

Die in unserer Studie beobachtete signifikant bessere funktionelle Erholung der EE-Gruppen legt nahe, dass EE neuroplastische Prozesse nach Schlaganfall fördert. Sowohl präklinische als auch klinische Studien zeigten, dass eine gezielte Stimulation neuronaler Netzwerke die funktionelle Regeneration unterstützen kann [253–256]. Hirnstimulationsverfahren wie transkranielle Magnetstimulation (TMS) oder transkranielle Gleichstromstimulation (tDCS) werden bereits in spezialisierten Zentren angewendet und konnten in einzelnen Studien moderate Effekte auf die motorische Funktion erzielen [257]. Obwohl in unserer Studie keine spezifischen Hirnareale gezielt stimuliert wurden, könnte die kontinuierliche Bewegung in EE eine ähnlich stimulierende Wirkung auf das gesamte Gehirn haben [258].

Zusammenfassend gibt es sowohl gute Daten für die Präkonditionierung durch Sport vor Schlaganfall als auch für die Nachbehandlung mit Sport und Physiotherapie. In unserer Studie konnten wir durch eine Kombination einen positiven Effekt verzeichnen, wobei in Folgearbeiten eine Kontrolle mittels EE-Intervention nur vor und nur nach Schlaganfall sinnvoll wäre, um die individuellen Präkonditionierungs- und Rehabilitationseffekte besser zu verstehen.

5.4. Modulation von Entzündungszellen und neuronalen Prozessen durch EE im Periinfarktareal

Die Qualitative Analyse der Zellverteilung im Periinfarktareal zeigte deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen auf. In den EE-Gruppen erschien die

Entzündungszellinfiltration in das umliegende Gewebe reduziert. Insbesondere in der CC HFD Gruppe erstreckte sich die Iba1-Zell Infiltration bis weit in die umliegenden Strukturen. Nach einer zerebralen Ischämie kommt es zu einer frühen proinflammatorischen Reaktion, die durch die Aktivierung von Mikroglia und die Infiltration von Monozyten und Makrophagen in das Gehirn verursacht wird und zu sekundären Gewebeschäden führt. Das Ausmaß der Schädigung kann durch eine proinflammatorische/ neurotoxische Polarisierung der Mikroglia gefördert (M1) und durch eine antiinflammatorische/ reparative (M2) Aktivierung gemindert werden [259]. Vorherige Studien zeigten, dass EE die Neuroinflammation nach einem Schlaganfall in Tiermodellen modulieren kann. Im Vergleich zur Standardhaltung führte EE nach Schlaganfall zu einer signifikant reduzierten Anzahl aktivierter Mikrogliazellen und Astrozyten in der Penumbra sowie zu einer verminderten Expression von M1-Markern wie induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und TNF-a und einer vermehrten Expression von Arg1, was für eine M2-Polarisierung spricht [260]. Diese entzündungshemmenden Effekte gingen mit einer besseren Regeneration der weißen Substanz, einer verminderten Demyelinisierung und einer signifikanten Verbesserung kognitiver Funktionen nach einem Schlaganfall einher [261]. Auch in weiteren Ergebnissen aus dieser Studie konnten eine verstärkte M2-Anwort im Infarkt und Periinfarkt-Gewebe gesehen werden (Ladwig et al. in Revision). Dadurch wird potenziell die Bildung einer stabileren Glianarbe begünstigt [262,263].

Astrozyten reagieren auf einen Schlaganfall mit reaktiver Astrogliose. Dabei bilden sie durch Vermehrung reaktiver Astrozyten und Mikroglia, die durch ein vergrößertes Zellkörpervolumen, hypertrophierte und verdickte Fortsätze sowie eine erhöhte Expression des Strukturproteins GFAP gekennzeichnet sind, eine Glianarbe, um die Läsion abzugrenzen und die Homöostase im ZNS zu sichern [264]. Die Bildung von Glianarben können die Ausbreitung der Neuroinflammation, die Läsionsgröße sowie das Hirnödem verringern und somit Hirnschäden nach einem Schlaganfall vorbeugen. Gleichzeitig fördert die Glianarbe die Wiederherstellung der BHS [265–267]. Demgegenüber führte die Hemmung der reaktiven Gliose und der Glianarbenbildung nach einem Schlaganfall zu einer Vergrößerung des Infarktgebiets und zu einer Verschlechterung des neurologischen Defizits [266].

Andererseits kann die Glianarbenbildung nach einem ischämischen Schlaganfall die axonale Regeneration sowie die funktionelle Erholung beeinträchtigen [264]. Die in der Glianarbe exprimierten Moleküle, wie Chondroitinsulfat-Proteoglykane, hemmen das axonale Wachstum aktiv. Dadurch wird die neuronale Plastizität eingeschränkt, was die funktionelle Erholung nach einer ischämischen Schädigung negativ beeinflusst [268]. Frühere Studien zeigten ebenfalls, dass Stoffwechselstörungen wie Diabetes und Adipositas die

Bildung von Glianarben nach ischämischen Ereignissen negativ beeinflussen. Dies geht mit einer verstärkten Expression von extrazellulären Matrix-Komponenten, wie CSPGs, sowie verstärkten Aktivierung von Astroglia und Mikroglia und einer höheren extrazelluläre Matrix (ECM)-Proteinsynthese einher [268]. In Vorergebnissen zu dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Glianarbe um den Schlaganfall herum signifikant breiter und die Astrozytendichte höher ist in den EE-Gruppen (Ladwig et al. in Revision, Orschel et al., Poster DGN 2019). Auch wenn eine Glianarbe möglicherweise die Neurogenese lokal unterbindet, scheint eine durch EE verstärkte Glianarbe zu einer effizienten Heilung beizutragen, indem sie den Austritt von Entzündungszellen aus dem Schlaganfallgebiet in das gesunde Gewebe einschränkt.

Zudem erschienen die Neurone im Periinfarktgewebe klarer abgrenzbar, mit weniger Zellfragmenten und deutlicher gefärbt als in den CC-Tieren. Auch in den Vorergebnissen (Tiere ohne Schlaganfall, gleicher Versuchsaufbau) konnten wir zeigen, dass die EE-Tiere eine vorrangig nukleäre Färbung im Vergleich zu CC und besonders CC HFD Tieren zeigten (Ladwig et al. in Revision). NeuN, ein etablierter Marker für Neurone, ist in den Kernen reifer Neurone des gesamten Nervensystems von Wirbeltieren vorhanden und spielt eine zentrale Rolle in der neuronalen Differenzierung [269].

NeuN ist ein Teil eines neuronalen Spleißproteins (Rbfox3), das die neuronale Differenzierung unterstützt [270]. Es hat zwei Isoformen – eine befindet sich im Zellkern (am häufigsten) und die andere im perinukleären Zytoplasma [271]. Studien haben gezeigt, dass ein Verlust der NeuN-Reaktivität nicht unbedingt einen neuronalen Verlust widerspiegeln muss, sondern auf einen Reaktivitätsverlust aufgrund von Veränderungen seines Phosphorylierungsstatus zurückzuführen sein kann oder den Stoffwechselzustand der Neuronen im Gegensatz zum neuronalen Tod widerspiegeln könnte [272,273]. Verletzungen des ZNS, wie axonale Durchtrennung, Entzündungen und Ischämie, können ebenfalls zu einem Verlust der NeuN-Reaktivität führen [274].

Yu und Kollegen haben berichtet, dass die Färbungsintensität von NeuN mit dekondensiertem Chromatin und der Expression von Markern für die Zellzyklusaktivität korreliert, und sie postulieren, dass einige reife Neuronen mit hohem NeuN-Gehalt sogar proliferieren könnten [275].

Die qualitativ deutlichere NeuN-Färbung bei den EE-Tieren könnte auf eine Zunahme der NeuN-Funktion hinweisen, was auf eine verstärkte neuronale Differenzierung durch vermehrtes Spleißen hindeuten kann, sowie auf eine erhöhte metabolische Aktivität. Weitere Untersuchungen, etwa mit Co-Färbungen der Mitochondrien und NeuN könnten helfen, die metabolischen Veränderungen besser zu verstehen.

Qualitative Auswertungen zur Zelldichte der Mikroglia, Astrozyten und Neurone folgen noch und sind nicht mehr Teil dieser Arbeit.

5.5. EE in Kombination mit HFD führt zu einer initial schlechteren Erholung

Die EE HFD-Gruppe wies zwar ebenfalls eine Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, jedoch war der Effekt unter der fettreichen Diät weniger stark ausgeprägt als in der EE NCD-Gruppe. Dies war insbesondere in der frühen Phase nach dem Schlaganfall der Fall. Die fehlende kontinuierliche Erholung in den ersten drei Tagen sowie die ebenfalls beobachtete erhöhte Mortalität der EE HFD Gruppe weist auf eine dysfunktionale Heilung in der EE HFD Gruppe hin. Dies könnte durch die negativen metabolischen Effekte der HFD auf entscheidende Hirnregionen (Hypothalamus, Hippocampus, Striatum) erklärt werden, welche auch unter EE nicht verbessert werden konnten (Ladwig et al., in Revision). Eine fettreiche Ernährung kann die Glukosehomöostase bereits kurzfristig stören, indem sie die GLUT-1-Expression im Gehirn reduziert. Dadurch sinkt die zerebrale Energieverfügbarkeit, was insbesondere in der ischämischen Penumbra zu verstärkter Gewebeschädigung führen kann [276,277]. Darüber hinaus stehen unsere Befunde im Einklang mit experimentellen Arbeiten, die unter HFD eine verstärkte Neuroinflammation und eingeschränkte vaskuläre Reparaturmechanismen beschreiben [278,279]. Diese Mechanismen können dazu beitragen, dass sich postischämische Mäuse unter EE + HFD trotz körperlicher Aktivität schlechter erholen als Tiere unter EE + NCD.

Die Tiere, die sich aus der initial schlechten Phase erholen konnten, verbesserten sich mit Training dann zunehmend. Dies zeigt, dass körperliche Aktivität selbst unter metabolisch ungünstigen Bedingungen einen protektiven Effekt entfalten kann. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass HFD die durch EE vermittelte funktionelle Anpassungsfähigkeit beeinträchtigt, jedoch nicht vollständig aufhebt.

5.6. Transkriptomveränderungen im Kleinhirn unter EE-Bedingungen

Verschiedene Hirnregionen können nach einem kortikalen Schlaganfall durch Diaschisis und sekundäre Neurodegeneration (SNDG) mitbetroffen sein. Dazu zählen der Thalamus, der Hippocampus, die Amygdala, die Substantia nigra sowie Faserbahnen wie das Corpus callosum [280]. Der Thalamus ist als zentrale subkortikale Schaltstelle eng mit kortikalen Arealen vernetzt und kann nach einer kortikalen Läsion eine entzündliche Mitreaktion sowie

im chronischen Verlauf sekundäre neurodegenerative Veränderungen entwickeln [281]. Dies verdeutlicht, dass Schlaganfälle nicht nur lokale Gewebeschäden verursachen, sondern auch Netzwerkstörungen, die sich auf entfernte Regionen auswirken. Während der Thalamus vor allem als Zielstruktur sekundärer Degeneration Einwanderung von Entzündungszellen und Wallerscher Degeneration und auch langfristig zu komplexen motorischen und sensorischen Problemen führen kann, ist die Kleinhirn-Diaschisis eher ein prognostischer Marker für den klinischen Outcome nach Schlaganfall. Vor diesem Hintergrund stellt das Kleinhirn eine geeignete Zielstruktur dar, um erholungsassoziierte Netzwerkveränderungen auf molekularer Ebene zu untersuchen.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Untersuchung der Genexpression und der Mechanismen, die für die unterschiedlichen Erholungsprozesse der Tiere nach einem Schlaganfall verantwortlich sein könnten. Ein zentrales Ziel war es, herauszufinden, warum die Tiere in der EE-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nach dem Schlaganfall ein besserer Outcome zeigten. Der Einfluss einer fettreichen Ernährung wurde hier nur am Rande berücksichtigt. Wie einleitend beschrieben, ist Enriched Environment eine Methode, die sich positiv auf Kognition, Gedächtnis und körperliche Funktion auswirkt. Diese positiven Effekte werden durch einen multifaktoriellen Prozess vermittelt: erhöhtes Gehirnvolumen, einer Förderung der Neuroplastizität, Synaptogenese, Neurogenese, neuronalen Reparaturprozessen nach Verletzungen, sowie eine verbesserte mitochondriale Funktion [79,282–284]. In der Analyse der mRNA, des Transkriptoms, konnten wir Gene identifizieren, die durch EE reguliert werden und die an den beschriebenen Prozessen mitwirken. Auf einige interessante Gene sowie Gruppen von Genen werde ich im Folgenden näher eingehen.

EE fördert synaptische Plastizität und Neurotransmission und schafft damit eine verbesserte Grundlage für funktionelle Erholung

Unsere Daten zeigten, dass EE die Expression von Genen erhöht, die für Acetylcholin-, Natrium- und Chloridkanäle sowie für Dopaminrezeptoren kodieren und eine entscheidende Rolle in der Neurotransmission spielen.

Die Transporter *Slc18a3* und *Slc5a7* sind zentrale Komponenten der cholinergen Signalübertragung und vor allem unter NCD-Bedingungen in EE hochreguliert. Sie sind entscheidend für die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin im ZNS [133]. Acetylcholin wirkt in der Peripherie als Neurotransmitter an neuromuskulären Verbindungen, im Gehirn hingegen hauptsächlich als Neuromodulator. Es beeinflusst die neuronale Erregbarkeit, die Neurotransmitterfreisetzung, die synaptische Plastizität (z. B. im Hippocampus über Nikotinische-(nAChRs) und Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

(mAChRs)) sowie die Langzeitpotenzierung [285]. Zudem ist Acetylcholin entscheidend für die neuronale Entwicklung, da es unter anderem die Reifung GABAerger und glutamaterger Synapsen fördert [285]. Darüber hinaus besteht eine enge Verbindung zwischen Acetylcholin und kognitiven Funktionen wie Lernen, Kurzzeitgedächtnis und Aufmerksamkeit [286,287].

Neben diesen cholinergen Effekten beeinflusste EE jedoch auch dopaminerge Signalwege. So zeigte sich eine gesteigerte Expression von *Drd1* in der EE HFD im Vergleich zur CC HFD Gruppe. In der EE-NCD-Gruppe war die Expression von *Drd1* im Vergleich zur CC-NCD-Gruppe erniedrigt. Darüber hinaus wiesen Gene der Dopaminrezeptor-Familie insgesamt eine erhöhte Expression unter EE-Bedingungen auf. So war *Drd2* sowohl in der EE-NCD- als auch in der EE-HFD-Gruppe im Vergleich zu den jeweiligen CC-Kontrollen erhöht exprimiert. Eine besonders ausgeprägte Hochregulation der Dopaminrezeptoren *Drd4* und *Drd5* zeigte sich vor allem in der EE-NCD-Gruppe, während diese Effekte in der EE-HFD-Gruppe weniger stark ausgeprägt waren. *Drd1* ist ein Dopaminrezeptor, welcher vor allem im Striatum, aber auch in anderen Hirnregionen wie dem Cortex und Hippocampus exprimiert wird [288]. Das dopaminerge System ist eng mit der Regulation der adulten Neurogenese verknüpft. *Drd1* reguliert die Proliferation und Differenzierung neuraler Stammzellen und spielt somit eine zentrale Rolle bei der frühen Entwicklung des menschlichen Gehirns [146]. Dopamin spielt darüber hinaus eine zentrale Rolle bei zahlreichen Gehirnfunktionen, darunter Lernen, motorische Kontrolle, Belohnungsverarbeitung, sowie emotionale Regulation [289]. Eine Studie von Tian Wang et al. (2018) demonstrierte, dass die Aktivierung von *Drd1* durch den Agonisten A68930 das neurologische Outcome nach intrazerebraler Blutung verbessert, indem sie die Nod-like-Rezeptor-Familie, Pyrin-Domäne-haltend 3 (NLRP3) vermittelte Entzündung hemmt [147]. Diese These wird durch eine weitere Untersuchung von Yan et al. (2015) gestützt, welche nachwies, dass der Neurotransmitter Dopamin über den *Drd1* die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms inhibiert. Dadurch wird eine übermäßige Entzündungsreaktion verhindert [290]. Des Weiteren belegen Studien, dass der *Drd1*-Agonist A-68930 sowohl kognitive Defizite als auch mitochondriale Dysfunktion sowohl in vivo als auch in vitro verbessern kann [291]. Neueste Forschungsergebnisse legen zudem dar, dass die Aktivierung von Drd1 zu einer verstärkten Translokation des Proteinrezeptors Tropomyosinrezeptorkinase (Trk)B an die Zelloberfläche führt und die Empfindlichkeit gegenüber BDNF erhöht. Die BDNF/TrkB-Signalübertragung stellt einen wesentlichen Regulator der kortiko-striatalen synaptischen Plastizität dar, welche mit einer verbesserten motorischen Erholung nach einem Schlaganfall assoziiert wird und auch als ein wichtiger Faktor in den EE-vermittelten Prozessen spielt [292,293]. Dies lässt vermuten, dass die Aktivierung von *Drd1* durch EE insbesondere unter hyperkalorischer Ernährung bei HFD zur Verringerung von

Entzündungen und zur Verbesserung der neurologischen Erholung nach einem Schlaganfall beiträgt und einen möglichen Kompensationsmechanismus darstellt.

Weitere wichtige Gene, die eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Signalübertragung an den Synapsen und damit für deren Funktion spielen, sind *Cacna1h, Kcnj4, Gsg1l, Doc2a* sowie *Gfra2* (in EE erhöht unter HFD). Darüber hinaus zeigten *Cacna1h* und *Doc2a* auch in der EE-NCD-Gruppe im Vergleich zur CC-NCD-Gruppe eine erhöhte Expression. Durch ihre Funktionen, wie die Regulation von Calciumkanälen (*Cacna1h*), der Kaliumhomöostase (*Kcnj4*), der glutamatergen Signalwege (*Gsg1l*) und der calciumabhängigen Freisetzung von Neurotransmittern (*Doc2a*), Signalübertragung neurotropher Faktoren (*Gfra2*) tragen sie zur Stabilität der neuronalen Kommunikation bei. Des Weiteren sind die Gene *Camkv*, *Thy1* und *Lrfn2* (in EE erhöht unter HFD) für die Organisation der synaptischen Funktion sowie die Regulation des axonalen Wachstums von entscheidender Bedeutung. Zum einen kodiert *Camkv* für eine Pseudokinase, die in dendritischen Spines als Struktur- und Signalmodulator wirkt und über lokale Synthese sowie Phosphorylierung die Stabilität der Spine-Architektur und damit die synaptische Plastizität sicherstellt [163]. Zum anderen stellt das Gen *Thy1* ein Zelloberflächen-Glykoprotein dar, das auf reifen Neuronen exprimiert wird und als zentrales Signalprotein in der Kommunikation zwischen Neuronen und Astrozyten wirkt [294]. Es ist entscheidend dafür, dass Astrozyten sich in einem nicht-reaktiven, homöostatischen Zustand befinden, und verhindert so eine übermäßige oder fehlgesteuerte Aktivierung der Astrozyten bei Stress, Verletzung oder Entzündung [295]. Zudem fungiert *Thy1* als wichtiger Regulator von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und spielt eine wesentliche Rolle in der neuronalen Regeneration [296]. In der EE-NCD-Gruppe zeigte *Thy1* im Vergleich zur CC-NCD-Gruppe ebenfalls eine erhöhte Expression. *Lrfn2* kodiert für ein synaptisches Adhäsionsprotein, das mit NMDA-Rezeptoren interagiert und sowohl die Funktion exzitatorischer als auch die Entwicklung inhibitorischer Synapsen steuert, wodurch es die neuronale Netzwerkorganisation beeinflusst [156].

Die Hochregulation der zahlreichen Gene, die an der Signalübertragung beteiligt sind, in EE NCD und EE HFD-Gruppe gegenüber CC NCD und CC HFD bestätigt, dass EE nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Aspekte der synaptischen Übertragung verstärkt. In der Gene Ontology Cell Compartment Analyse zeigten sich die signifikantesten Gene im Vergleich zwischen EE und CC vorrangig in den Synapsen und Membranen von Neuronen lokalisiert (Abb. 20D). Dies bestätigt die Ergebnisse der Einzelgenanalyse. EE fördert demnach über die synaptische Integrität und die Struktur der Zellmembranen.

EE begünstigt neuronale Regeneration und strukturelles Remodeling

Nach einem Schlaganfall ist es essenziell für die Heilung, neue Netzwerke aufzubauen. Neben der Größe des geschädigten Areals ist die Ausprägung der Netzwerkverbindungen entscheidend für die Funktion.

Chodl, *Hoxc4* und *Ecel1* sind Gene, die unter EE NCD Bedingungen und *Fgf7* und *Barhl1* unter EE HFD am stärksten hochreguliert waren (siehe Volcano Plot, Abb.17). Alle diese Gene sind direkt am Axonwachstum, der Synapsenbildung und/oder der motorischen Innervation beteiligt.

Insbesondere *Fgf7*, ein Mitglied der Fibroblast growth factor-Familie, könnte diesen Regenerationsprozess unterstützen. Die Studie von Dordoe et al. (2021) analysierte die Bedeutung der Ffg-Gruppe, die zur Förderung der neuronalen Protektion, der Neuroregeneration, des Gefäßschutzes, der Angiogenese und der Stabilisierung der BHS nach einem ischämischen Schlaganfall beitragen [297]. Eine aktuelle Studie zeigte, dass *Fgf7* Herzmuskelzellen nach einem Myokardinfarkt schützt, indem es über den PI3Kα/AKT-Signalweg die Aktivierung von Nrf2 sowie die mitochondriale Lokalisation von Hexokinase 2 (HXK2) fördert. Dadurch wird die Produktion und Ansammlung von ROS reduziert, was wiederum die mitochondriale Dysfunktion verringert und die durch ROS induzierte Zellapoptose verhindert [298].

Barhl1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Migration und des Überlebens von Körnerzellen im Kleinhirn [152].

Chodl fördert die Synapsenbildung und Axonverzweigung, was für die funktionelle Regeneration nach einem Schlaganfall entscheidend ist [299].

Auch das Gen *Itga5*, hier in EE unter HFD herunterreguliert, spielt eine besondere Rolle. Neuere Forschungsergebnisse zeigten, dass die Hemmung der Hochregulierung von Itga5 das Überleben von Hippocampus-Neuronen bei Sauerstoff-Glukose-Entzug und Reperfusion fördern kann. Dies eröffnet neue therapeutische Perspektiven und Zielstrukturen für die Behandlung von ischämischen Schlaganfällen [300].

Das Homebox Gene *Hoxc4* (in EE NCD hochreguliert) spielt eine zentrale Rolle in der embryonalen Gehirnentwicklung [135]. Weitere Homeodomain-Transkriptionsfaktoren, wie *Hoxa2*, *Hoxa3*, *Hoxa4*, *Hoxb2*, *Hoxb3*, *Hoxb3os*, *Hoxb4*, *Hoxd3*, waren ebenfalls in EE NCD stark hochreguliert. Diese Hox-Gene spielen eine zentrale Rolle bei der Organisation, Positionierung und Verschaltung von Neuronen im Hinterhirn und Rückenmark. Durch die

Regulation neuronaler Differenzierung, Migration und Konnektivität tragen sie maßgeblich zur synaptischen Spezifität und zur Ausbildung funktioneller neuronaler Schaltkreise bei [301].

Ecel1 ist laut Studie von Kiryu-Seo et al. (2019) wichtig für die Bildung von Verzweigungen motorischer Axone. Ein Mangel an *Ecel1* bei Mäusen kann zu einer insuffizienten Atemmuskulatur und damit zu Atemversagen und Tod unmittelbar nach der Geburt führen [140]. Nagata et al. (2017) zeigten, dass Missense-Mutationen in *Ecel1* zu motorischen Innervationsdefekten und zur Entwicklung angeborener Kontrakturen führen [302]. Im Rahmen der Rehabilitation nach einem Schlaganfall könnte die gezielte Förderung oder Modulation des *Ecel1*-Gens die motorischen Fähigkeiten verbessern und die Genesung beschleunigen. Während in der EE NCD-Gruppe im Vergleich zur CC NCD-Gruppe eine deutliche Hochregulation von *Ecel1* beobachtet wurde, zeigte sich in der EE HFD-Gruppe im Vergleich zur CC HFD-Gruppe lediglich eine minimale Hochregulation.

EE erhöht die Expression von Genen, die Synapsenstabilität, Zellstruktur und Neurogenese unterstützen

Die Gene *Prph*, *Vill*, *Hs3st3a1*, *Gm3488*, *Susd2*, sowie *Pigp*, spielen eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der synaptischen Integrität, der Stabilisierung der Zellstruktur und der Zell-Zell Interaktionen und fanden sich hier vor allem unter NCD in EE hochreguliert.

Besonders hervorzuheben ist Peripherin (*Prph*), ein Intermediärfilamentprotein der Klasse III, das vor allem im peripheren Nervensystem für Neuritenwachstum, axonale Stabilität und den axonalen Transport, während der Myelinisierung essenziell ist. Peripherin interagiert mit Neurofilamenten und verschiedenen Kinasen und beeinflusst dadurch die Zytoskelettdynamik sowie neuronale Funktionen [303]. Die Studie von Keddie et al. (2023) wies Peripherin zudem eine wichtige Rolle als Biomarker für axonale Schäden zu und bestätigt seine Bedeutung für die Stabilisierung der Zellstruktur und die axonale Regeneration [304].

Das unter EE (NCD und HFD) runterregulierte Gen *Gprin3* führt unter verminderter Expression in striatalen Neuronen zu einer erhöhten dendritischen Verzweigung bei gleichzeitig verminderter neuronaler Erregbarkeit. Funktionell geht dies mit einer gesteigerten Motivation und einer abgeschwächten Reaktion auf Kokain einher. Dies deutet auf eine vorzeitige strukturelle Anpassung dopamin- und glutamatsensitiver Synapsen hin, welches eine verminderte dopaminerge Signaltransduktion zur Folge hat [186].

Pigp ist ein essenzielles Gen der Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker-Biosynthese und ermöglicht die korrekte Verankerung zahlreicher Proteine an der Zelloberfläche und ist

damit entscheidend für eine normale neuronale Entwicklung und Funktion. Mutationen im Gen *Pigp* können wiederum zu schweren Störungen der neuronalen Entwicklung sowie zu epileptischen Enzephalopathien führen [305]. Es wäre denkbar, dass eine Stimulation von *Pigp* durch EE nach Schlaganfall die neuronale Funktion stabilisiert und Dysfunktionen vorbeugt.

Ein weiteres für neuronale Prozesse relevantes Gen ist *Tafa*-1, hochreguliert in EE HFD, das stark im erwachsenen Hippocampus exprimiert wird und die Proliferation und Differenzierung neuronaler Stammzellen reguliert. Somit spielt *Tafa-1* eine Schlüsselrolle in der Gehirnentwicklung und Neurogenese [306]. Insgesamt fungieren Tafa-Proteine als Neurokine im zentralen und peripheren Nervensystem, wobei sie verschiedene Prozesse regulieren, darunter Bewegung, Nahrungsaufnahme, Lernen, Gedächtnis, Angstverhalten und soziale Kommunikation [155]. Eine erhöhte Expression war zudem in der EE NCD-Gruppe gegenüber der CC NCD-Gruppe nachweisbar.

Zu den unter EE runterregulierten Genen gehörten unter NCD: *Mov10*, *Mfap3*, *Usp9x*, *Gnpnat1*, *Mllt3*, *Rif1*, *Tox4* und unter HFD: *Itga5*, *Gprin3*, *Ldlrad4*, *Setd1A*, *Sez6l*, *Mybpc*. Diese Gene spielen ebenfalls eine Rolle in der Differenzierung und Organisation zellulärer Strukturen.

EE moduliert Gene der Immunantwort

Entzündungen und Immunreaktionen können nach einem Schlaganfall sowohl schädliche als auch protektive Auswirkungen haben [307,308]. Mikroglia spielen dabei eine zentrale Rolle, indem sie entweder pro- oder antiinflammatorisch agieren. In entzündungsfördernden Zuständen kann eine Aktivierung der Mikroglia die Ausdehnung des Infarkts und somit die Entwicklung sekundärer Hirnschäden fördern. Gleichzeitig sind sie jedoch in der Lage, entzündungshemmende Zytokine und neurotrophe Faktoren freizusetzen, welche die Remodellierung und Reparatur des Gewebes unterstützen und somit die Genesung nach einem Schlaganfall fördern [37,309]. Auch T-Zellen spielen bei der Entzündung nach einem Schlaganfall eine entscheidende Rolle. Während einige Arten von T-Zellen die Entwicklung von Entzündungsreaktionen fördern und ischämische Gewebeschäden bei Patienten mit akutem ischämischem Schlaganfall verschlimmern können, scheinen andere T-Zellen neuroprotektive Effekte zu haben und exzessive Entzündungen durch Immunsuppression und andere Mechanismen zu reduzieren [310]. In diesem Zusammenhang konnten wir eine weitere Gruppe von Genen identifizieren, die an diesen Prozessen der Immunregulation beteiligt sind. Zu den hoch regulierten Genen in der EE NCD-Gruppe gehören *Cd83*, *Skap1*, sowie *Ighm*.

Hierbei wurde eine Hochregulierung des Gens *Cd83* in EE sowohl in der NCD- als auch in der HFD-Gruppe gegenüber den jeweiligen CC-Kontrollen beobachtet. *Cd83* ist ein Transmembranprotein und gehört zur Familie der Immunglobin-Rezeptormoleküle [311]. Besonders hervorzuheben ist eine Studie, bei der bei Mäusen mit einer Deletion von *Cd83* in regulatorischen T-Zellen (Tregs) ein deutlich stärker aktivierter, proinflammatorischer Phänotyp beobachtet wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die *Cd83*-Expression in regulatorischen T-Zellen ein entscheidender Faktor für deren Entwicklung und Funktion ist [312]. Diese sogenannten Tregs spielen demnach eine schützende Rolle bei der Modulation der Immunantwort nach ischämischem Schlaganfall [307,313]. Es wird vermutet, dass sie dazu beitragen, die Immunreaktion nach einem Schlaganfall zu regulieren und die Genesung durch Eindämmung der Entzündung zu fördern. Eine Fehlregulation der Tregs wird mit Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen in Verbindung gebracht. Behandlungen, die auf die Infiltration von T-Zellen, insbesondere von regulatorischen T-Zellen (Tregs), abzielen, könnten daher potenzielle therapeutische Ansätze für die Rehabilitation nach einem ischämischen Schlaganfall darstellen [312].

Ein weiteres Gen, das in EE NCD hochreguliert war und die Immunantwort moduliert, ist *Skap1*. Das Adapterprotein *Skap1* spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulierung der Zelladhäsion und der Proliferation von T-Zellen. Dadurch wird die T-Zell-Signalübertragung und die Immunfunktion beeinflusst. *Skap1* verstärkt positiv die Signalgebung des T-Zell-Rezeptors, indem es den MAP-Kinase-Weg aktiviert [314]. Darüber hinaus ist es entscheidend für eine effektive Konjugation zwischen T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen, da es das Clustern des Integrins ITGAL auf der Oberfläche von T-Zellen fördert [315]. Die vollständige Funktionsweise von *Skap1* ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt, sodass weitere Studien zu diesem Protein wichtige Erkenntnisse über die Regulation der Immunfunktion liefern können.

Des Weiteren war das Immunglobulin Heavy Constant Mu (*Ighm*) in EE NCD hochreguliert. *Ighm* stellt einen Bestandteil des Immunglobulin-Systems dar und reguliert die Produktion von IgM-Antikörpern [196]. *Ighm* wird aber im Gehirn auch von kortikothalamischen Neuronen in Schicht 6 und von Mikroglia exprimiert [316]. *Ighm* wäre somit einem Mikroglia- und Neuron spezifisches Target von EE im Gehirn, welches möglicherweise durch Beeinflussung der hirneigenen Immunabwehr zur Steuerung von Immunreaktionen nach Läsionen beitragen kann.

In EE herunterreguliertes Gen ist *Selenoi* ein Selenoprotein, dessen Funktion im Myelinisierungsprozess und in der neuronalen Entwicklung liegt [317]. In beiden EE-Gruppen (EE NCD und EE HFD) zeigte *Selenoi* eine verminderte Expression gegenüber CC NCD

und CC HFD. Die Dysregulation von *Selenoi* kann zu einer Mehrexpression von TDP-43 führen, welches am Krankheitsprozess der ALS beteiligt ist [318]. Es gibt bis dato keine Studien zu der Expression von *Selenoi* nach Schlaganfall, aber von anderen Selenoproteinen weiß man, dass sie auf oxidativen Stress reagieren [319]. Denkbar wäre hier eine kompensatorische Reaktion der CC-Gruppen auf den erhöhten Stress, der in den EE-Gruppen nicht in diesem Maß vorhanden ist. Die Interpretation bleibt jedoch spekulativ und mehr Daten sind vonnöten.

EE wirkt antiinflammatorisch durch die Herunterregulation Stress- und Entzündungsgene

Wie oben bereits beschrieben, ist die Reduktion proinflammatorischer Signalwege ein zentraler Mechanismus, durch den EE neuroprotektiv wirkt. Die herunterregulierten Gene deuten auf eine Abschwächung von MAPK-, Aktivator-Protein (AP)-1- und Komplement-vermittelten Entzündungsreaktionen hin. In der Folge konnten wir eine weitere Gruppe von Genen identifizieren, die an diesen Prozessen wie der Regulation pro-apoptotischer und pro-inflammatorischer Signalwege beteiligt sind. Die in EE NCD herunterregulierten Genen umfassten *Fos*, *Dusp1*, *Fosl2*, *Irf9*, *C3*, *Qser1*, *Tmem74bos*, sowie in EE HFD *Il17re* und *Tnfrsf13b* (vgl. Tbl. 12).

Fos kodiert für den Transkriptionsfaktor *c-Fos*. Die Fos Gene sind assoziiert mit Apoptose, Proliferation und Differenzierung. Dieser Marker wird breit genutzt, um neuronale Aktivierung zu detektieren bspw. mittels immunohistochemischer Färbung. Die mRNA ist unmittelbar (30-45min) nach Stimulation in den Nervenzellen nachweisbar. Die Level sinken danach auch rasch wieder [320]. *C-Fos* spielt weiterhin eine Rolle in der Aktivierung von Apoptose. Studien zeigten, dass die Hochregulation von *c-Fos* über den FasL/Fas-Signalweg mit neuronaler Apoptose nach ICH assoziiert ist [321]. Auch Hypoxie oder Hyperkapnie erhöht die Anzahl von *c-Fos*-markierten Zellen an mehreren spezifischen Stellen des Hirnstamms, die somit an der Anpassung des zentralen Atemantriebs beteiligt sind [322]. Darüber hinaus führt eine fettreiche Diät bei Mäusen zu einer erhöhten *c-Fos*-Expression und daraus resultierende Immunreaktion im Hypothalamus [323]. Studie von Valdivia fand heraus, dass akutes HFD die *c-Fos*-Expression in mehreren belohnungsbezogenen Hirnarealen aktiviert, darunter im ventralen Tegmentalbereich (VTA), im Nucleus accumbens, in der zentralen Amygdala und im lateralen hypothalamischen Bereich [324]. *C-Fos* wird aber nicht nur von Neuronen, sondern auch von Gliazellen exprimiert. In Gliazellen wird *c-Fos* unter anderem als Antwort auf Zellschäden exprimiert. In Mikroglia kann Lipopolysaccharide die *c-Fos* Expression erhöhen [325].

Auch in unserer Studie haben wir in immunhistochemischen Färbungen *c-Fos* Anreicherungen im Infarktgebiet darstellen können. Hier zeigte sich eine deutliche Anreicherung in den Makrophagen und Mikroglia (Ladwig et al. in Revision). Laut Babaei und Kollegen könnte *c-Fos* eine duale Rolle haben - als Marker für neuronale Entwicklung, Lernen und Gedächtnisbildung im gesunden Gehirn (wobei es nach Habituation herunterreguliert wird), aber auch als Marker für neuronalen Untergang, wenn dauerhaft überexprimiert sowie in Gliazellen als Aktivierungsmarker für Zellstress [326].

Ein weiteres Gen aus der Fos – Gen Familie, ist *Fosl2* (in EE NCD und EE HFD herunterreguliert). Auch dieses Gen wird von Neuronen exprimiert [327], scheint aber eine wichtige Rolle in der Immunregulation zu spielen. Die Ergebnisse der Studie von Renoux et al. zeigten, dass *Fosl2* die Differenzierung von T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen (Tregs) unterdrücken kann und somit Inflammation und Autoimmunität fördert [203].

Ein weiteres Gen, welches in EE NCD deutlich heruntereguliert war, ist *Irf9*, Mitglied der Interferon-Regulationsfaktor (IRF)-Familie, der angeborene Immunreaktionen reguliert, und bereits mit neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht [205], darunter auch zerebraler Ischämie. Studien haben gezeigt, dass *Irf9* als Reaktion auf akute Ischämie/Reperfusion (I/R)-Stress die Sirt1-Deacetylase Aktivität verringert und somit p53 Acetylierung erhöht, welches direkt zum neuronalen Tod führt. Dies kann neuronale Schäden und neurologische Defizite nach einem Schlaganfall möglicherweise verschlechtern [328].

Das Gen *C3*, ein Teil des Komplementsystems, kann als prognostischer Marker für die Schwere und Prognose von Schlaganfällen dienen. In einer Studie von P. Yang et al. waren erhöhte Serumspiegel von *C3* mit ungünstigen klinischen Ergebnissen nach einem ischämischen Schlaganfall assoziiert [329]. *C3* war im Gehirn nach einem ischämischen Schlaganfall erhöht, und die Hemmung der *C3*-Aktivität konnte den ischämischen Hirnschaden reduzieren. In einem Mausmodell für vorübergehende zerebrale Mangeldurchblutung konnte bereits gezeigt werden, dass bei neugeborenen und erwachsenen Ratten, die einer Hypoxie-Ischämie-Operation unterzogen wurden, die Verabreichung von Kobragiftfaktor (CVF) die Ischämie bedingte *C3*-Hochregulation gehemmt werden kann und die Entzündungsreaktion lindern, das Hirninfarktvolumen reduzieren und neurologische Defizite nach 1 bis 7 Tagen zerebraler Ischämie lindern [330].

Auch Interleukine spielen eine entscheidende Rolle beim ischämischen Schlaganfall, indem sie T-Zellen als B-Zellen aktivieren, ihre Differenzierung und Proliferation regulieren, die Entzündungsreaktion modulieren und damit den Krankheitsverlauf und das Outcome beeinflussen [331]. Der IL-17-Rezeptor, der im ZNS in Neuronen, Mikroglia und Astrozyten

exprimiert wird, spielt eine entscheidende Rolle bei der Modulation von Entzündungsprozessen im zentralen Nervensystem [212]. Er bindet das Zytokin IL-17, dass die Aktivierung von T-Zellen fördert und die Expression verschiedener entzündungsfördernder Zytokine induziert [331]. *Il17re* ist Teil des IL-17 Rezeptorkomplexes, an welchen IL17C bindet, dies resultiert in der Initiierung einer Entzündungsreaktion. Eine Überstimulation kann zu einer chronischen Entzündung führen und zur Schädigung von Nervenzellen beitragen [332].

In dieser Studie zeigte sich das *Il17re* Gen in CC HFD erhöht im Vergleich zu allen anderen Gruppen (signifikant zu EE HFD) und könnte zu der überschießenden Entzündungsreaktion und verzögerten Heilung beitragen, die wir in CC HFD beobachten konnten.

EE aktiviert anti-apoptotischer und depressionsmodulierender Gene mit neuroprotektiver Wirkung

Eine weitere Gruppe von Genen, die mit anti-apoptotischen Wegen assoziiert werden und in EE HFD hochreguliert waren, umfasst die Gene *Tox3*, *Faim* und *Six3os1* (vgl. Tbl. 13). Die genannten Gene tragen zur neuroprotektiven Wirkung von EE bei, indem sie den programmierten Zelltod in Neuronen verhindern und die Schädigung des Gehirns nach einem ischämischen Schlaganfall reduzieren [333]. Zusätzlich zu diesem Effekt konnte in einer Studie von Zou et al. gezeigt werden, dass die Hochregulierung des Gens *Six3os1* durch den EE-Effekt depressive Symptome bei Mäusen reduzieren kann [217]. Dies bestätigt, dass körperliche Aktivität eine wirksame Behandlungsmethode für Depressionen sein kann [334]. Wie oben beschrieben, sind Post-Stroke-Depressionen sind mit einer deutlichen Minderung von Lebensqualität vergesellschaftet und Sport kann helfen diese zu mindern [335,336].

EE beeinflusst Gene der Blutgerinnung und des Lipidstoffwechsels

Apoh und *F2* waren in CC NCD im Vergleich zu den anderen Gruppen stark hochreguliert und sind Teil der Blutgerinnung. Mehrere Studien haben die Rolle von Thrombin, dessen Vorstufe das Prothrombin (*F2*) ist, im Kontext des ischämischen Schlaganfalls näher untersucht. Thrombin kann über zelluläre Interaktionen zu Störungen der BHS, der Bildung von Hirnödemen, einer Neuroinflammation sowie dem Untergang von Nervenzellen führen. Demgegenüber fördern niedrige Thrombinkonzentrationen das Überleben von Zellen [337]. Allerdings muss man hier einwenden, dass in der näheren Betrachtung nur ein Tier aus der CC NCD Gruppe diese Gene wirklich deutlich überexprimierte. Die restlichen CC NCD Tiere lagen von der Expression sehr ähnlich wie die restlichen Gruppen. Ähnliche Ergebnisse konnten wir bei *F10* und den Apolipoproteinen *Apoa*, *Apoc*, *Apof* und *Apoh* finden, sodass wir hier von einem Outlier ausgehen. Bei anderen Genen fiel dieses Tier

nicht derart auf, sodass das Tier nicht generell von der Analyse ausgeschlossen wurde (siehe Sample Distance Plot Abb. 16).

Bei dem Angiopoietin-ähnlichen Protein, *Angptl3*, das eine zentrale Rolle bei der Regulierung des Lipidstoffwechsels spielt und in der gesamten CC NCD-Gruppe im Vergleich zur EE-Gruppe hochreguliert war. *Angptl3* kodiert für ein in der Leber produziertes Glykoprotein, das den Lipidstoffwechsel moduliert, indem es die Lipoproteinlipase sowie die Endotheliale Lipase hemmt [221]. Eine Studie von Kosmas et al. zeigte, dass die Hemmung von *Angptl3* durch spezielle Medikamente eine vielversprechende Therapieoption für Hypercholesterinämie darstellen könnte [221]. Demnach stellt *Angptl3* nicht nur einen Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit dar [338], sondern spielt auch eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose und Schlaganfällen. Bei *Angptl7* sahen wir eine Erhöhung in beiden CC-Gruppen.

5.7. EE aktiviert Gene der oxidativen Phosphorylierung und fördert mitochondriale Resilienz nach Schlaganfall

Nach der Einzelgenanalyse verwendeten wir die KEGG-Pathway- und die GSEA-Analysen, um nun nach biologisch relevanten Netzwerken und Prozessen zu suchen. Bei Lebensstil-Interventionen wie durch EE und Ernährung ist eine Erklärung durch einzelne Gene unwahrscheinlich. Die Pfad- und Netzwerkanalyse spiegelt hier deutlich besser die breite Art der Intervention wider und beruht nicht nur auf einzelnen Signifikanzen. In beiden EE-Gruppen zeigten sich in der KEGG-Analyse im Vergleich zu den CC-Gruppen eine signifikante Anreicherung von mitochondrialen und ribosomalen Genen, was auf eine gesteigerte mitochondriale Aktivität und potenziell erhöhte Energieversorgung sowie gesteigerte Proteinsynthese durch Ribosomen in der EE-Gruppe hinweist. Es ist bereits durch zahlreiche Studien belegt, dass körperliche Aktivität der effektivste Ansatz zur Förderung der mitochondrialen Gesundheit ist, nicht nur in der Muskulatur, sondern auch in anderen Geweben [339].

Besonders auffällig war die Hochregulation von mitochondrialer Gene wie der Cytochrom-c-Oxidase, der NADH-Dehydrogenase und der ATP-Synthase in der EE NCD Gruppe. Von den 27 gemessenen Cox Genen zeigten 9 einen signifikanten EE-Effekt mit Hochregulation beider EE-Gruppen und 3 einen deutlichen Trend ($p < 0,1$). Von den 48 NADH-Genen

zeigten 12 einen EE-Effekt und 8 einen Trend. Im Gegensatz dazu fand sich kaum ein Diät Effekt oder ein mitochondriales oder ribosomales Gen, auf welches EE einen signifikant negativen Effekt hatte. Insbesondere das *Cox7b2* Gen fiel bereits in den Volcano Plots und den Einzelgenanalysen auf. Diese Enzyme sind Teil der Atmungskette und tragen dazu bei, den Zellen zusätzliche Energie in Form von ATP durch oxidative Phosphorylierung zur Verfügung zu stellen. Darüber hinaus kann die mitochondriale Funktion verbessert und reguliert werden, da die Cytochrom-C-Oxidase, die für den sauerstoffabhängigen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Atmungskette verantwortlich ist, die ATP-Versorgung der Zellen steuert [340]. Über diese Regulation beeinflusst sie zugleich das mitochondriale Membranpotenzial sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Neuronen sind in besonderem Maße auf Mitochondrien angewiesen, da neurologische Prozesse einen sehr hohen Energiebedarf haben [341]. Das Gehirn macht zwar nur 2 % der Körpermasse aus, verbraucht aber 20 % des gesamten vom Körper verbrauchten Sauerstoffs [342]. Aufgrund dieses hohen Energiebedarfs sind Neurone besonders empfindlich gegenüber einem Mangel an Glukose und ATP, was dazu führt, dass sie als erste Zellen im Gehirn absterben, wenn der Blutfluss in bestimmten Bereichen eingeschränkt ist [342]. Es gibt bereits mehrere Studien, die die wichtige Rolle der Mitochondrien bei der Rehabilitation nach einem Schlaganfall hervorheben. Eine Studie von Hayakawa et al. identifizierte einen mitochondrialen Mechanismus der neuroglialen Interaktion. Dabei wird der Transfer von Mitochondrien von Astrozyten zu Neuronen durch extrazelluläre Vesikel als förderlich für das neuronale Überleben in der akuten Phase eines Schlaganfalls beschrieben. Gleichzeitig wird eine unterstützende Wirkung auf die neuronale Plastizität angenommen [51]. Weitere Studien belegen, dass sowohl der Hirninfarkt als auch der neuronale Zelltod durch den Einsatz exogener Mitochondrien oder mitochondrialer Transplantate gemildert werden können [343,344]. Daraus folgt, dass die EE-Gruppe möglicherweise durch eine bessere mitochondriale Versorgung auch im Schlaganfall eine bessere Ischämietoleranz aufweisen könnte. Dieses Konzept wurde bereits durch Vorarbeiten belegt [345].

In der CC HFD Gruppe war dieser supprimierende Effekt auf die mitochondriale Biosynthese oft am stärksten ausgeprägt. Eine fettreiche Ernährung kann die mitochondriale Funktion im Gehirn beeinträchtigen. Dies geschieht durch metabolische Veränderungen wie ER-Stress und oxidativen Stress, die langfristig den Verlust von Oligodendrozytenvorläuferzellen und Myelinzellen begünstigen [346]. Eine weitere Studie bestätigt, dass eine fettreiche Ernährung bei Tieren zu erhöhten Entzündungsmarkern und oxidativem Stress führt, was wiederum die mitochondrialen Oxidationskapazität und den BDNF-Signalweg beeinträchtigt, der für die synaptische Plastizität und den Energiestoffwechsel entscheidend ist [347]. Wie oben dargelegt, sahen wir in der

Immunhistochemie eine deutlichere Kernfärbung von NeuN. Die Ergebnisse der Transkriptomuntersuchung unterstützen die Annahme, dass die Neurone unter EE eine gesteigerte metabolische Funktion bzw. mitochondriale und ribosomale Biosynthese haben. Interessanterweise sahen wir in den FDG-PET-Analysen aus Ladwig et al., dass die EE NCD Tiere gegenüber den CC NCD Tieren einen regionsspezifisch reduzierten Stoffwechsel aufweisen. Dieses Paradox wäre erklärt, wenn man in Betracht zieht, dass Mitochondrien für eine sehr effektive Glukosenutzung sorgen. Aus einem Glukosemolekül können 30-32 ATPs gewonnen werden, wohingegen durch Glykolyse nur 2 ATP-Moleküle gewonnen werden können [348,349]. Da das PET im Ruhezustand aufgenommen wurde, wäre hier denkbar, dass die Regionen mit reduziertem Stoffwechsel einen reduzierten Ruheverbrauch haben. Dies wäre vergleichbar mit einem erniedrigten Ruhepuls bei Sportlern, was für eine bessere Energiehomöostase spricht.

Auch in Bezug auf die ribosomalen Gene zeigte sich ein deutlicher Effekt, welcher auch in der GSEA-Analyse (Abb. 20) deutlich wurde. Von den 61 Rps Genen hatten 18 einen signifikanten EE-Effekt und 13 einen deutlichen Trend, ähnlich wie bei den mitochondrialen Genen.

In einer Studie von Wang et al. wurde bereits die Theorie aufgestellt, dass die Ribosomen-Biogenese die Erholung nach einem Schlaganfall fördern könnte, da sie für die Proteinsynthese der Entzündungsreaktion sowie für die neuronale Reparatur und Regeneration wichtig ist [350].

Darüber hinaus zeigten neuere Studien, dass Neuronen über Mechanismen der lokalen Ribosomen-Biogenese und -reifung in dendritischer und axonaler Kompartimente verfügen. Dies ermöglicht eine rasche Anpassung der translationalen Kapazität an externe Reize, einschließlich bewegungsinduzierter Stimuli [351,352].

Eine intakte neuronale Ribosomen-Biogenese ist essenziell für die Proteinsynthese, welche das Wachstum und den Erhalt des dendritischen Baums unterstützt. Defizite in der ribosomalen Ausstattung hingegen führen zu verminderter Translation, gestörter dendritischer Morphologie und potenziell zu neurodegenerativen Veränderungen [353].

Bewegung führt zudem zur Freisetzung sogenannter Exerkine wie BDNF, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) und Fibronectin type III domain-containing protein 5 (FNDC5)/Irisin. Diese überwinden die Blut-Hirn-Schranke und aktivieren intrazelluläre Signalwege wie AMPK, Sirtuin 1 (SIRT1) und Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1α), welche den neuronalen Energiestoffwechsel sowie synaptische Plastizität regulieren und im Zusammenhang mit einer erhöhten Expression ribosomaler

Proteingene stehen [354]. Diese Steigerung der lokalen Proteinsynthese ist bedeutend für neuronale Plastizität und neuroprotektive Mechanismen.

Ergänzend moduliert körperliche Aktivität die Redoxhomöostase durch eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität sowie durch die Regulation ROS-abhängiger und zytokinvermittelter Signalwege, welche wiederum die ribosomale Funktion und die neuronale Proteinsynthese beeinflussen können [355,356].

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass körperliche Aktivität die lokale translationale Kapazität erhöht, und somit neurogenetische Prozesse, synaptische Stabilität sowie die funktionelle Anpassungsfähigkeit des Gehirns fördert. Dies erklärt die neuroprotektiven Effekte regelmäßiger Bewegung auf molekularer Ebene.

In der GOCC-Analyse zeigten sich die am stärksten angereicherte Gene lokalisiert in den Synapsen und Membranen von Neuronen. Hier wäre denkbar, dass die mitochondriale und ribosomale Anreicherung auch in den synaptischen Kompartimenten von Neuronen stattfinden könnte. Eine Studie von 2020 zeigte, dass auch Ribosomen über die Länge des Axons transportiert werden und direkt vor Ort Proteine synthetisieren können [357]. Für die Bestätigung dieser These wären allerdings elektronenmikroskopische oder immunhistochemische Untersuchungen der Synapsen nötig.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass EE im direkten Vergleich mit den jeweiligen Kontrollgruppen eine konsistente Verbesserung der neurologischen Scores zeigte. Dieser Effekt war bereits ab dem ersten Tag nach dem Schlaganfall nachweisbar und hielt über den gesamten Beobachtungszeitraum an.

In dieser Arbeit wurde der Neuroscore eingesetzt, ein Verfahren, das drei Testkomponenten – das allgemeine Erscheinungsbild, einen sensomotorischen Test sowie den Grid-Walk-Test – integriert und damit eine breitere Abbildung motorischer und koordinativer Defizite erfasst. Obwohl dieser präklinische neurologischer Score nicht direkt mit klinischen Skalen wie der National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) oder dem modified Rankin Scale (mRS) vergleichbar [358] ist und für Tiermodelle bislang keine minimal clinically important differences (MCID) definiert wurden [359], entspricht er den Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR)-Empfehlungen, mehrere funktionelle Untersuchungen als Bewertungsgrundlage einzusetzen und diese miteinander zu kombinieren [360]. Damit nähert sich der Score in seinem Aufbau den klinischen

Bewertungssystemen an. Vor diesem Hintergrund können Gruppenunterschiede, die konsistent über mehrere Messzeitpunkte auftreten, als Hinweis auf eine funktionell bedeutsame Wirkung interpretiert werden. Darüber hinaus stärkt die Kombination aus histologischen Analysen (Immunhistochemie), funktionellen Tests (Neuroscore) und molekularen Untersuchungen (Transkriptomik) die Aussagekraft der Ergebnisse, da beobachtete Effekte nicht auf einer einzelnen methodischen Ebene beruhen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren über mehrere Messzeitpunkte hinweg konsistent und hochsignifikant nachweisbar. Die Repeated-Measures-ANOVA ergab einen signifikanten Haupteffekt der Umgebung ($p < 0{,}0001$). Die konsistent niedrigen p-Werte sowohl in der Varianzanalyse als auch in den Post-hoc-Analysen bestätigen die statistische Relevanz der beobachteten Gruppenunterschiede.

Auch unter der HFD wirkte EE protektiv, indem sie einem prolongierten Gewichtsverlust entgegenwirkt und sowohl zu Beginn als auch im Verlauf bessere klinische Ergebnisse als die CC HFD erzielte. Im Vergleich zur EE-NCD-Gruppe zeigte sich jedoch eine verzögerte Erholung, sowohl der klinischen Parameter als auch des Körpergewichts. Dies deutet auf einen nachteiligen Einfluss der HFD trotz physischer Aktivität hin.

Die Ursachen der besseren Erholung der EE-Tiere wurden auf immunhistochemisch sowie transkriptomischer Ebene analysiert. Dabei zeigte sich eine bessere Eingrenzung der entzündlichen Reaktion auf das Infarktgebiet, die mit einem erhöhten Schutz Neuronen einherging. Darüber hinaus wiesen die EE-Tiere aufgrund einer sechswöchigen Präkonditionierung bereits unmittelbar nach PT eine bessere funktionelle Ausgangslage auf. Diese Effekte könnten durch eine verbesserte mitochondriale Funktion, insbesondere durch eine erhöhte Expression von Genen der Atmungskette sowie durch eine gesteigerte Aktivität des ribosomalen Syntheseapparats, vermittelt sein. Die verbesserte Schlaganfallheilung unter EE war zudem mit einer veränderten Expression anti-inflammatorischer, immunregulatorischer, neuroprotektiver und reparativer Gene assoziiert. Durch die Förderung der neuronalen Plastizität und die Veränderung der Synapsendichte kann EE die Kommunikation zwischen Nervenzellen verbessern und die Anpassungsfähigkeit des Gehirns an verschiedene Veränderungen unterstützen. Dies ist insbesondere für die Rehabilitation nach einem Schlaganfall von Bedeutung, da eine verstärkte Synapsenbildung die Erholungsprozesse erheblich fördern kann.

Translational bestätigt diese Studie den Vorteil einer gesunden Lebensführung, bei dem nicht nur auf Sport oder Ernährung Wert gelegt wird, sondern beides zusammen wichtig ist. Nur die Kombination von beidem konnte ein klinisch optimales Ergebnis erzielen und die HFD in der Sportgruppe kann zusätzliche Gefahren zu Beginn der Schlaganfallheilung

aufweisen. Auch in Krankenhäusern und auf Stroke Units sollte auf multimodale Stimulation, Bewegung, sowie eine ausgewogene Ernährung nach Schlaganfall geachtet werden, um ein optimales Ergebnis zu erzielen. Weitere Studien am Menschen sollten sich auf den Nutzen von nicht-medikamentösen additiven Therapien fokussieren, da diese zumindest bis heute nicht durch eine medikamentöse Behandlung ersetzbar sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass körperliche Aktivität eine vielversprechende nicht-pharmakologische Präventionsstrategie darstellt, die neuroprotektive Effekte fördert und sowohl die negativen Auswirkungen einer zerebralen Ischämie als auch die Schwere der motorischen Folgen nach einem Schlaganfall reduzieren kann. Die explorative Studie liefert somit wertvolle Hinweise auf molekulare Angriffspunkte, die das Outcome nach Schlaganfall verbessern könnten.

5.8. Limitationen und Übertragbarkeit

Mausmodell und Übertragbarkeit

Ein wichtiger Aspekt dieser Studie ist die Frage, inwieweit die Ergebnisse auf andere Populationen, insbesondere den Menschen, übertragen werden können. Das Mausgenom weist eine hohe Ähnlichkeit zum menschlichen Genom auf, was eine Grundlage für den Einsatz von Tieren zur Erforschung menschlicher Krankheiten und zur Vorhersage von Reaktionen auf Therapien bietet [361]. Dennoch wird der Nutzen von Mäusen als Modelle für menschliche Krankheiten oft in Frage gestellt, weil sie im Gegensatz zum Menschen in einer kontrollierten Laborumgebung leben [362]. Zusätzlich könnte die Haltung der Tiere und die Durchführung der Verhaltenstests die Tiere erheblich gestresst haben, was wiederum die Ergebnisse der Studie beeinflusst haben könnte. Darüber hinaus könnten Umweltfaktoren wie die Lichtverhältnisse und die Art der Haltung das Verhalten und die physiologischen Reaktionen der Tiere beeinflusst haben. Beispielsweise wurden die Tiere wiederholt aus ihren Käfigen herausgenommen, und es gab einen häufigen Wechsel des Equipments, was als zusätzlicher Stress angesehen werden kann.

Begrenzte Vergleichbarkeit des EE-Modells mit klinischer Rehabilitation

Das EE-Modell ist eine standardisierte experimentelle Intervention, die nur eingeschränkt auf die klinische Rehabilitation übertragbar ist. Während EE im Tiermodell eine kontinuierliche Kombination aus spontaner motorischer Aktivität, sensorischer und kognitiver Stimulation sowie sozialer Interaktion darstellt, sind Rehabilitationsprogramme beim Menschen individuell angepasst, zeitlich begrenzt, therapeutisch geleitet sowie an

spezifische Defizite gebunden [51]. Zudem ist bislang unklar, welche Komponenten der Umweltanreicherung – körperliche Aktivität, soziale Interaktion oder kognitive Stimulation – die entscheidenden Wirkfaktoren für die Förderung neuronaler Plastizität sind und in welcher Intensität sie klinisch wirksam wären.

6. Literaturverzeichnis

1 Adamson J, Beswick A, Ebrahim S. Is stroke the most common cause of disability? *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc* 2004; **13**: 171–7.

2 GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol* 2021; **20**: 795–820.

3 Robert Koch-Institut. 12-Monats-Prävalenz von Schlaganfall oder chronischen Beschwerden infolge eines Schlaganfalls in Deutschland. 2017. DOI:10.17886/RKI-GBE-2017-010.

4 Kolominsky-Rabas PL, Sarti C, Heuschmann PU, *et al.* A prospective community-based study of stroke in Germany--the Erlangen Stroke Project (ESPro): incidence and case fatality at 1, 3, and 12 months. *Stroke* 1998; **29**: 2501–6.

5 Palm F, Urbanek C, Rose S, *et al.* Stroke Incidence and Survival in Ludwigshafen am Rhein, Germany: the Ludwigshafen Stroke Study (LuSSt). *Stroke* 2010; **41**: 1865–70.

6 Crichton SL, Bray BD, McKevitt C, Rudd AG, Wolfe CDA. Patient outcomes up to 15 years after stroke: survival, disability, quality of life, cognition and mental health. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016; **87**: 1091–8.

7 Feigin VL, Barker-Collo S, Parag V, *et al.* Auckland Stroke Outcomes Study. Part 1: Gender, stroke types, ethnicity, and functional outcomes 5 years poststroke. *Neurology* 2010; **75**: 1597–607.

8 Luengo-Fernandez R, Paul NLM, Gray AM, *et al.* Population-based study of disability and institutionalization after transient ischemic attack and stroke: 10-year results of the Oxford Vascular Study. *Stroke* 2013; **44**: 2854–61.

9 Feigin VL, Owolabi MO. Pragmatic solutions to reduce the global burden of stroke: a World Stroke Organization–Lancet Neurology Commission. *Lancet Neurol* 2023; **22**: 1160–206.

10 Wathen CA, Frizon LA, Maiti TK, Baker KB, Machado AG. Deep brain stimulation of the cerebellum for poststroke motor rehabilitation: from laboratory to clinical trial. *Neurosurg Focus* 2018; **45**: E13.

11 Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, *et al.* Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke* 2006; **37**: 1179–83.

12 Hakim AM. Depression, strokes and dementia: new biological insights into an unfortunate pathway. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2011; **2011**: 649629.

13 Swardfager W, MacIntosh BJ. Depression, Type 2 Diabetes, and Poststroke Cognitive Impairment. *Neurorehabil Neural Repair* 2017; **31**: 48–55.

14 Grefkes C, Fink GR. Recovery from stroke: current concepts and future perspectives. *Neurol Res Pract* 2020; **2**: 17.

15 Li H, Huang J, Ye S, *et al.* Predictors of mortality in acute ischemic stroke treated with endovascular thrombectomy despite successful reperfusion: subgroup analysis of a multicentre randomised clinical trial. *BMJ Open* 2022; **12**: e053765.

16 Heo NH, Lee MR, Yang KH, *et al.* Short- and long-term mortality after intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke. *Medicine (Baltimore)* 2021; **100**: e27652.

17 Shahid J, Kashif A, Shahid MK. A Comprehensive Review of Physical Therapy Interventions for Stroke Rehabilitation: Impairment-Based Approaches and Functional Goals. *Brain Sci* 2023; **13**: 717.

18 Wang H, Li D, Li S, *et al.* Physical activity interventions for post-stroke cognitive recovery: a systematic review and network meta-analysis of comparative effects. *Front Neurol* 2025; **16**: 1646328.

19 O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S, *et al.* Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *Lancet Lond Engl* 2016; **388**: 761–75.

20 Bhupathiraju SN, Hu FB. Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. *Circ Res* 2016; **118**: 1723–35.

21 Lau L-H, Lew J, Borschmann K, Thijs V, Ekinci EI. Prevalence of diabetes and its effects on stroke outcomes: A meta-analysis and literature review. *J Diabetes Investig* 2019; **10**: 780–92.

22 Govori V, Budinčević H, Morović S, Đerke F, Demarin V. Updated Perspectives on Lifestyle Interventions as Secondary Stroke Prevention Measures: A Narrative Review. *Medicina (Mex)* 2024; **60**: 504.

23 Bailey RR. Lifestyle Modification for Secondary Stroke Prevention. *Am J Lifestyle Med* 2016; **12**: 140–7.

24 Baird TA, Parsons MW, Barber PA, *et al.* The influence of diabetes mellitus and hyperglycaemia on stroke incidence and outcome. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas* 2002; **9**: 618–26.

25 Robbins NM, Swanson RA. Opposing effects of glucose on stroke and reperfusion injury: acidosis, oxidative stress, and energy metabolism. *Stroke* 2014; **45**: 1881–6.

26 Aigner A, Grittner U, Rolfs A, Norrving B, Siegerink B, Busch MA. Contribution of Established Stroke Risk Factors to the Burden of Stroke in Young Adults. *Stroke* 2017; **48**: 1744–51.

27 Tabish SA. Is Diabetes Becoming the Biggest Epidemic of the Twenty-first Century? *Int J Health Sci* 2007; **1**: V–VIII.

28 Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. *Neuron* 2010; **67**: 181–98.

29 Stuckey SM, Ong LK, Collins-Praino LE, Turner RJ. Neuroinflammation as a Key Driver of Secondary Neurodegeneration Following Stroke? *Int J Mol Sci* 2021; **22**: 13101.

30 Yu S-W, Andrabi SA, Wang H, *et al.* Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 18314–9.

31 Cirillo C, Brihmat N, Castel-Lacanal E, *et al.* Post-stroke remodeling processes in animal models and humans. *J Cereb Blood Flow Metab* 2020; **40**: 3–22.

32 Ladwig A, Walter HL, Hucklenbroich J, *et al.* Osteopontin Augments M2 Microglia Response and Separates M1- and M2-Polarized Microglial Activation in Permanent Focal Cerebral Ischemia. *Mediators Inflamm* 2017; **2017**: 7189421.

33 Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 1998; **56**: 149–71.

34 Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol* 2016; **173**: 649–65.

35 Rust R, Nih LR, Liberale L, *et al.* Brain repair mechanisms after cell therapy for stroke. *Brain* 2024; **147**: 3286–305.

36 Vay SU, Flitsch LJ, Rabenstein M, *et al.* The plasticity of primary microglia and their multifaceted effects on endogenous neural stem cells in vitro and in vivo. *J Neuroinflammation* 2018; **15**: 226.

37 Wang Y, Leak RK, Cao G. Microglia-mediated neuroinflammation and neuroplasticity after stroke. *Front Cell Neurosci* 2022; **16**: 980722.

38 Hu X, Li P, Guo Y, *et al.* Microglia/Macrophage Polarization Dynamics Reveal Novel Mechanism of Injury Expansion After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 2012; **43**: 3063–70.

39 Wu H, Zheng J, Xu S, *et al.* Mer regulates microglial/macrophage M1/M2 polarization and alleviates neuroinflammation following traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 2021; **18**: 2.

40 Tian Y, Jing G, Ma M, Yin R, Zhang M. Microglial activation and polarization in type 2 diabetes-related cognitive impairment: A focused review of pathogenesis. *Neurosci Biobehav Rev* 2024; **165**: 105848.

41 Jin R, Yang G, Li G. Molecular insights and therapeutic targets for blood–brain barrier disruption in ischemic stroke: Critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol Dis* 2010; **38**: 376–85.

42 Grønberg NV, Johansen FF, Kristiansen U, Hasseldam H. Leukocyte infiltration in experimental stroke. *J Neuroinflammation* 2013; **10**: 892.

43 Choudhury GR, Ding S. Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke. *Neurobiol Dis* 2016; **85**: 234–44.

44 Dalise S, Ambrosio F, Modo M. Brain plasticity and recovery in preclinical models of stroke. *Arch Ital Biol* 2014; **152**: 190–215.

45 Mollet I, Marto JP, Mendonça M, Baptista MV, Vieira HLA. Remote but not Distant: a Review on Experimental Models and Clinical Trials in Remote Ischemic Conditioning as Potential Therapy in Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol* 2022; **59**: 294–325.

46 Dandi E, Spandou E, Dalla C, Tata DA. The neuroprotective role of environmental enrichment against behavioral, morphological, neuroendocrine and molecular changes following chronic unpredictable mild stress: A systematic review. *Eur J Neurosci* 2023; **58**: 3003–25.

47 Farokhi-Sisakht F, Farhoudi M, Sadigh-Eteghad S, Mahmoudi J, Mohaddes G. Cognitive Rehabilitation Improves Ischemic Stroke-Induced Cognitive Impairment: Role of Growth Factors. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2019; **28**: 104299.

48 Vaquero-Rodríguez A, Ortuzar N, Lafuente JV, Bengoetxea H. Enriched environment as a nonpharmacological neuroprotective strategy. *Exp Biol Med* 2023; **248**: 553–60.

49 Gabriel P, Mastracchio T-A, Bordner K, Jeffrey R. Impact of enriched environment during adolescence on adult social behavior, hippocampal synaptic density and dopamine D2 receptor expression in rats. *Physiol Behav* 2020; **226**: 113133.

50 Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2006; **7**: 697–709.

51 McDonald MW, Hayward KS, Rosbergen ICM, Jeffers MS, Corbett D. Is Environmental Enrichment Ready for Clinical Application in Human Post-stroke Rehabilitation? *Front Behav Neurosci* 2018; **12**: 135.

52 Oppici L, Bērziņa G, Hestetun-Mandrup AM, *et al.* A Scoping Review of Preclinical Environmental Enrichment Protocols in Models of Poststroke to Set the Foundations for Translating the Paradigm to Clinical Settings. *Transl Stroke Res* 2025; published online Feb 6. DOI:10.1007/s12975-025-01335-3.

53 Xu Y, Chen Y, Xing J, Yao J. Relationship between enriched environment and neurodegeneration: a review from mechanism to therapy. *Clin Epigenetics* 2025; **17**: 13.

54 Greenough WT, Hwang HM, Gorman C. Evidence for active synapse formation or altered postsynaptic metabolism in visual cortex of rats reared in complex environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**: 4549–52.

55 Jung CKE, Herms J. Structural dynamics of dendritic spines are influenced by an environmental enrichment: an in vivo imaging study. *Cereb Cortex N Y N 1991* 2014; **24**: 377–84.

56 Kempermann G, Gast D, Gage FH. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* 2002; **52**: 135–43.

57 van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 2000; **1**: 191–8.

58 Shen X, Luo L, Wang F, *et al.* An Enriched Environment Enhances Angiogenesis Surrounding the Cingulum in Ischaemic Stroke Rats. *Neural Plast* 2020; **2020**: 8840319.

59 Zang Q, Wang S, Qi Y, *et al.* Running exercise improves spatial learning and memory ability and enhances angiogenesis in the cerebral cortex via endogenous nitric oxide. *Behav Brain Res* 2023; **439**: 114243.

60 Ali S, Liu X, Queen NJ, *et al.* Long-term environmental enrichment affects microglial morphology in middle age mice. *Aging* 2019; **11**: 2388–402.

61 Gao Z-K, Shen X-Y, Han Y, Guo Y-S, Yuan M, Bi X. Enriched Environment Effects on Myelination of the Central Nervous System: Role of Glial Cells. *Neural Plast* 2022; **2022**: 5766993.

62 Rossi C, Angelucci A, Costantin L, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 2006; **24**: 1850–6.

63 Vazquez-Sanroman D, Sanchis-Segura C, Toledo R, Hernandez ME, Manzo J, Miquel M. The effects of enriched environment on BDNF expression in the mouse cerebellum depending on the length of exposure. *Behav Brain Res* 2013; **243**: 118–28.

64 Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol* 2000; **164**: 45–52.

65 Nithianantharajah J, Levis H, Murphy M. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiol Learn Mem* 2004; **81**: 200–10.

66 Alwis DS, Rajan R. Environmental enrichment and the sensory brain: the role of enrichment in remediating brain injury. *Front Syst Neurosci* 2014; **8**: 156.

67 Galani R, Berthel M-C, Lazarus C, *et al.* The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. *Neurobiol Learn Mem* 2007; **88**: 1–10.

68 Naka F, Narita N, Okado N, Narita M. Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment. *Brain Dev* 2005; **27**: 275–8.

69 Xie K, Duan W, Xu Y, *et al.* Enriched environment mitigates anxiety and depression-like behaviors induced by SNI via restoration of AMPA and NMDA receptors function in mice. *J Psychiatr Res* 2025; **188**: 74–86.

70 Ramos TL, de Sousa Fernandes MS, da Silva Fidélis DE, *et al.* The impact of enriched environments on cerebral oxidative balance in rodents: a systematic review of environmental variability effects. *Front Neurosci* 2024; **18**. DOI:10.3389/fnins.2024.1366747.

71 Yu K, Kuang S, Wang C, *et al.* Changes in Mitochondria-Associated Protein Expression and Mitochondrial Function in Response to 2 Weeks of Enriched Environment Training After Cerebral Ischaemia-Reperfusion Injury. *J Mol Neurosci MN* 2020; **70**: 413–21.

72 de Sousa Fernandes MS, Costa MR, Badicu G, *et al.* Can Environmental Enrichment Modulate Epigenetic Processes in the Central Nervous System Under Adverse Environmental Conditions? A Systematic Review. *Cell Mol Neurobiol* 2024; **44**: 69.

73 Tang BL. Axon regeneration induced by environmental enrichment- epigenetic mechanisms. *Neural Regen Res* 2020; **15**: 10–5.

74 Zhang T-Y, Keown CL, Wen X, *et al.* Environmental enrichment increases transcriptional and epigenetic differentiation between mouse dorsal and ventral dentate gyrus. *Nat Commun* 2018; **9**: 298.

75 Morse SJ, Butler AA, Davis RL, Soller IJ, Lubin FD. Environmental Enrichment Reverses Histone Methylation Changes in the Aged Hippocampus and Restores Age-Related Memory Deficits. *Biology* 2015; **4**: 298–313.

76 Han P-P, Han Y, Shen X-Y, Gao Z-K, Bi X. Enriched environment-induced neuroplasticity in ischemic stroke and its underlying mechanisms. *Front Cell Neurosci* 2023; **17**: 1210361.

77 Zhao L-R, Willing A. Enhancing endogenous capacity to repair a stroke-damaged brain: An evolving field for stroke research. *Prog Neurobiol* 2018; **163–164**: 5–26.

78 Johansson BB. Functional and cellular effects of environmental enrichment after experimental brain infarcts. *Restor Neurol Neurosci* 2004; **22**: 163–74.

79 Johansson BB, Belichenko PV. Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 2002; **22**: 89–96.

80 Dahlqvist P, Rönnbäck A, Risedal A, *et al.* Effects of postischemic environment on transcription factor and serotonin receptor expression after permanent focal cortical ischemia in rats. *Neuroscience* 2003; **119**: 643–52.

81 Gobbo OL, O'Mara SM. Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. *Behav Brain Res* 2004; **152**: 231–41.

82 Komitova M, Perfilieva E, Mattsson B, Eriksson PS, Johansson BB. Enriched environment after focal cortical ischemia enhances the generation of astroglia and NG2 positive polydendrocytes in adult rat neocortex. *Exp Neurol* 2006; **199**: 113–21.

83 Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, Eriksson PS. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke* 2005; **36**: 1278–82.

84 Ruscher K, Shamloo M, Rickhag M, *et al.* The sigma-1 receptor enhances brain plasticity and functional recovery after experimental stroke. *Brain J Neurol* 2011; **134**: 732–46.

85 Lin Y, Yao M, Wu H, *et al.* Environmental enrichment implies GAT-1 as a potential therapeutic target for stroke recovery. *Theranostics* 2021; **11**: 3760–80.

86 Ruscher K, Johannesson E, Brugiere E, Erickson A, Rickhag M, Wieloch T. Enriched environment reduces apolipoprotein E (ApoE) in reactive astrocytes and attenuates inflammation of the peri-infarct tissue after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 2009; **29**: 1796–805.

87 Chen X, Zhang X, Xue L, Hao C, Liao W, Wan Q. Treatment with Enriched Environment Reduces Neuronal Apoptosis in the Periinfarct Cortex after Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 2017; **41**: 1445–56.

88 Simpson DB, Breslin M, Cumming T, *et al.* Sedentary time and activity behaviors after stroke rehabilitation: Changes in the first 3 months home. *Top Stroke Rehabil* 2021; **28**: 42–51.

89 King A, McCluskey A, Schurr K. The time use and activity levels of inpatients in a co-located acute and rehabilitation stroke unit: an observational study. *Top Stroke Rehabil* 2011; **18 Suppl 1**: 654–65.

90 Anåker A, Kevdzija M, Elf M. Enriched Environments in Stroke Units: Defining Characteristics and Limitations. *Herd* 2024; **17**: 344–59.

91 Janssen H, Bernhardt J, Collier JM, *et al.* An enriched environment improves sensorimotor function post-ischemic stroke. *Neurorehabil Neural Repair* 2010; **24**: 802–13.

92 Qin H, Reid I, Gorelik A, Ng L. Environmental enrichment for stroke and other non-progressive brain injury. *Cochrane Database Syst Rev* 2021; **2021**: CD011879.

93 Anåker A, von Koch L, Sjöstrand C, Heylighen A, Elf M. The physical environment and patients' activities and care: A comparative case study at three newly built stroke units. *J Adv Nurs* 2018; published online April 20. DOI:10.1111/jan.13690.

94 Cao L, Choi EY, Liu X, *et al.* White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metab* 2011; **14**: 324–38.

95 Janssen H, Ada L, Middleton S, *et al.* Altering the rehabilitation environment to improve stroke survivor activity: A Phase II trial. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc* 2022; **17**: 299–307.

96 Kevdzija M, Marquardt G. Stroke patients' nonscheduled activity during inpatient rehabilitation and its relationship with the architectural layout: A multicenter shadowing study. *Top Stroke Rehabil* 2022; **29**: 9–15.

97 White JH, Alborough K, Janssen H, Spratt N, Jordan L, Pollack M. Exploring staff experience of an 'enriched environment' within stroke rehabilitation: a qualitative sub-study. *Disabil Rehabil* 2014; **36**: 1783–9.

98 Webb A, Papp AC, Curtis A, *et al.* RNA sequencing of transcriptomes in human brain regions: protein-coding and non-coding RNAs, isoforms and alleles. *BMC Genomics* 2015; **16**: 990.

99 Twine NA, Janitz C, Wilkins MR, Janitz M. Sequencing of hippocampal and cerebellar transcriptomes provides new insights into the complexity of gene regulation in the human brain. *Neurosci Lett* 2013; **541**: 263–8.

100 Chappell S, Patel T, Guetta-Baranes T, *et al.* Observations of extensive gene expression differences in the cerebellum and potential relevance to Alzheimer's disease. *BMC Res Notes* 2018; **11**: 646.

101 Horvath S, Mah V, Lu AT, *et al.* The cerebellum ages slowly according to the epigenetic clock. *Aging* 2015; **7**: 294–306.

102 Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet* 1992; **2**: 324–9.

103 Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, *et al.* Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* 1993; **34**: 609–16.

104 Sakamoto S, Ishii K. Low cerebral glucose extraction rates in the human medial temporal cortex and cerebellum. *J Neurol Sci* 2000; **172**: 41–8.

105 Gelfo F, Florenzano F, Foti F, Burello L, Petrosini L, De Bartolo P. Lesion-induced and activity-dependent structural plasticity of Purkinje cell dendritic spines in cerebellar vermis and hemisphere. *Brain Struct Funct* 2016; **221**: 3405–26.

106 De Bartolo P, Florenzano F, Burello L, Gelfo F, Petrosini L. Activity-dependent structural plasticity of Purkinje cell spines in cerebellar vermis and hemisphere. *Brain Struct Funct* 2015; **220**: 2895–904.

107 Kim H-W, Oh S, Lee SH, *et al.* Different types of multiple-synapse boutons in the cerebellar cortex between physically enriched and ataxic mutant mice. *Microsc Res Tech* 2019; **82**: 25–32.

108 Angelucci F, De Bartolo P, Gelfo F, *et al.* Increased concentrations of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat cerebellum after exposure to environmental enrichment. *Cerebellum Lond Engl* 2009; **8**: 499–506.

109 Naka F, Shiga T, Yaguchi M, Okado N. An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. *Brain Res* 2002; **924**: 124–6.

110 Uphouse L. In vitro RNA synthesis by chromatin from three brain regions of differentially reared rats. *Behav Biol* 1978; **22**: 39–49.

111 Uphouse L, Tedeschi B. Environmental enrichment and brain chromatin. *Behav Neural Biol* 1979; **25**: 268–70.

112 Eshra A, Hirrlinger P, Hallermann S. Enriched Environment Shortens the Duration of Action Potentials in Cerebellar Granule Cells. *Front Cell Neurosci* 2019; **13**: 289.

113 Scholz J, Allemang-Grand R, Dazai J, Lerch JP. Environmental enrichment is associated with rapid volumetric brain changes in adult mice. *NeuroImage* 2015; **109**: 190–8.

114 Zhang J, Zhang Y, Xing S, Liang Z, Zeng J. Secondary neurodegeneration in remote regions after focal cerebral infarction: a new target for stroke management? *Stroke* 2012; **43**: 1700–5.

115 Carrera E, Tononi G. Diaschisis: past, present, future. *Brain J Neurol* 2014; **137**: 2408–22.

116 Fornito A, Zalesky A, Breakspear M. The connectomics of brain disorders. *Nat Rev Neurosci* 2015; **16**: 159–72.

117 Sobesky J, Thiel A, Ghaemi M, *et al.* Crossed cerebellar diaschisis in acute human stroke: a PET study of serial changes and response to supratentorial reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 2005; **25**: 1685–91.

118 Yamada H, Koshimoto Y, Sadato N, *et al.* Crossed cerebellar diaschisis: assessment with dynamic susceptibility contrast MR imaging. *Radiology* 1999; **210**: 558–62.

119 Infeld B, Davis SM, Lichtenstein M, Mitchell PJ, Hopper JL. Crossed cerebellar diaschisis and brain recovery after stroke. *Stroke* 1995; **26**: 90–5.

120 van Niftrik CHB, Sebök M, Muscas G, *et al.* Investigating the Association of Wallerian Degeneration and Diaschisis After Ischemic Stroke With BOLD Cerebrovascular Reactivity. *Front Physiol* 2021; **12**: 645157.

121 Grefkes C, Fink GR. Reorganization of cerebral networks after stroke: new insights from neuroimaging with connectivity approaches. *Brain J Neurol* 2011; **134**: 1264–76.

122 Sinke MRT, van Tilborg GAF, Meerwaldt AE, *et al.* Remote Corticospinal Tract Degeneration After Cortical Stroke in Rats May Not Preclude Spontaneous Sensorimotor Recovery. *Neurorehabil Neural Repair* 2021; **35**: 1010–9.

123 Yu X, Wu K, Li Y, *et al.* Dynamic Reorganization Patterns of Brain Modules after Stroke Reflecting Motor Function. *J Integr Neurosci* 2024; **23**: 182.

124 Pang X, Huang L, He H, *et al.* Reorganization of Dynamic Network in Stroke Patients and Its Potential for Predicting Motor Recovery. *Neural Plast* 2024; **2024**: 9932927.

125 Chan HH, Wathen CA, Mathews ND, *et al.* Lateral cerebellar nucleus stimulation promotes motor recovery and suppresses neuroinflammation in a fluid percussion injury rodent model. *Brain Stimulat* 2018; **11**: 1356–67.

126 Zhu Y, Yang J, Wang K, *et al.* Effects of Cerebellar Transcranial Magnetic Stimulation on the Motor Function of Patients With Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Brain Behav* 2025; **15**: e70471.

127 Walter HL, van der Maten G, Antunes AR, Wieloch T, Ruscher K. Treatment with AMD3100 attenuates the microglial response and improves outcome after experimental stroke. *J Neuroinflammation* 2015; **12**: 24.

128 Hamzei Taj S, Kho W, Aswendt M, *et al.* Dynamic Modulation of Microglia/Macrophage Polarization by miR-124 after Focal Cerebral Ischemia. *J Neuroimmune Pharmacol Off J Soc NeuroImmune Pharmacol* 2016; **11**: 733–48.

129 Zhu A, Ibrahim JG, Love MI. Heavy-tailed prior distributions for sequence count data: removing the noise and preserving large differences. *Bioinforma Oxf Engl* 2019; **35**: 2084–92.

130 Du J, Li M, Yuan Z, *et al.* A decision analysis model for KEGG pathway analysis. *BMC Bioinformatics* 2016; **17**: 407.

131 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 15545–50.

132 Pomaznoy M, Ha B, Peters B. GOnet: a tool for interactive Gene Ontology analysis. *BMC Bioinformatics* 2018; **19**: 470.

133 Lawal HO, Krantz DE. SLC18: Vesicular neurotransmitter transporters for monoamines and acetylcholine. *Mol Aspects Med* 2013; **34**: 360–72.

134 English BA, Hahn MK, Gizer IR, *et al.* Choline transporter gene variation is associated with attention-deficit hyperactivity disorder. *J Neurodev Disord* 2009; **1**: 252–63.

135 Reichert H, Bello B. Hox genes and brain development in Drosophila. *Adv Exp Med Biol* 2010; **689**: 145–53.

136 Sleigh JN, Barreiro-Iglesias A, Oliver PL, *et al.* Chondrolectin affects cell survival and neuronal outgrowth in in vitro and in vivo models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2014; **23**: 855–69.

137 Barclay M, Noakes PG, Ryan AF, Julien J-P, Housley GD. Neuronal expression of peripherin, a type III intermediate filament protein, in the mouse hindbrain. *Histochem Cell Biol* 2007; **128**: 541–50.

138 GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search. https://www.genecards.org/ (accessed April 13, 2026).

139 Kirov A, Kacer D, Conley BA, Vary CPH, Prudovsky I. AHNAK2 Participates in the Stress-Induced Nonclassical FGF1 Secretion Pathway. *J Cell Biochem* 2015; **116**: 1522–31.

140 Kiryu-Seo S, Nagata K, Saido TC, Kiyama H. New Insights of a Neuronal Peptidase DINE/ECEL1: Nerve Development, Nerve Regeneration and Neurogenic Pathogenesis. *Neurochem Res* 2019; **44**: 1279–88.

141 Laboy JT, Bonner J, Norman KR. DEC-7/SUSD2, a sushi domain-containing protein, regulates an ultradian behavior mediated by intestinal epithelial Ca2+ oscillations in Caenorhabditis elegans. *Am J Physiol Cell Physiol* 2023; **324**: C1158–70.

142 Zhao B, Gong W, Ma A, *et al.* SUSD2 suppresses CD8+ T cell antitumor immunity by targeting IL-2 receptor signaling. *Nat Immunol* 2022; **23**: 1588–99.

143 Johnstone DL, Nguyen T-T-M, Murakami Y, *et al.* Compound heterozygous mutations in the gene PIGP are associated with early infantile epileptic encephalopathy. *Hum Mol Genet* 2017; **26**: 1706–15.

144 Fujimoto Y, Tedder TF. CD83: a regulatory molecule of the immune system with great potential for therapeutic application. *J Med Dent Sci* 2006; **53**: 85–91.

145 Seifert HA, Vandenbark AA, Offner H. Regulatory B cells in experimental stroke. *Immunology* 2018; **154**: 169–77.

146 Wang Q, Dong X, Lu J, Hu T, Pei G. Constitutive activity of a G protein-coupled receptor, DRD1, contributes to human cerebral organoid formation. *Stem Cells Dayt Ohio* 2020; **38**: 653–65.

147 Wang T, Nowrangi D, Yu L, *et al.* Activation of dopamine D1 receptor decreased NLRP3-mediated inflammation in intracerebral hemorrhage mice. *J Neuroinflammation* 2018; **15**: 2.

148 Ciuculete DM, Boström AE, Tuunainen A-K, *et al.* Changes in methylation within the STK32B promoter are associated with an increased risk for generalized anxiety disorder in adolescents. *J Psychiatr Res* 2018; **102**: 44–51.

149 Liao C, Sarayloo F, Vuokila V, *et al.* Transcriptomic Changes Resulting From STK32B Overexpression Identify Pathways Potentially Relevant to Essential Tremor. *Front Genet* 2020; **11**: 813.

150 Terauchi A, Johnson-Venkatesh EM, Toth AB, Javed D, Sutton MA, Umemori H. Distinct FGFs promote differentiation of excitatory and inhibitory synapses. *Nature* 2010; **465**: 783–7.

151 Zhang X, Bao L, Yang L, Wu Q, Li S. Roles of intracellular fibroblast growth factors in neural development and functions. *Sci China Life Sci* 2012; **55**: 1038–44.

152 Li S, Qiu F, Xu A, Price SM, Xiang M. Barhl1 Regulates Migration and Survival of Cerebellar Granule Cells by Controlling Expression of the Neurotrophin-3 Gene. *J Neurosci* 2004; **24**: 3104.

153 Lopes C, Delezoide A-L, Delabar J-M, Rachidi M. BARHL1 homeogene, the human ortholog of the mouse Barhl1 involved in cerebellum development, shows regional and cellular specificities in restricted domains of developing human central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **339**: 296–304.

154 Khalaj AJ, Sterky FH, Sclip A, *et al.* Deorphanizing FAM19A proteins as pan-neurexin ligands with an unusual biosynthetic binding mechanism. *J Cell Biol* 2020; **219**: e202004164.

155 Sarver DC, Lei X, Wong GW. FAM19A (TAFA): An Emerging Family of Neurokines with Diverse Functions in the Central and Peripheral Nervous System. *ACS Chem Neurosci* 2021; **12**: 945–58.

156 Li Y, Kim R, Cho YS, *et al.* Lrfn2-Mutant Mice Display Suppressed Synaptic Plasticity and Inhibitory Synapse Development and Abnormal Social Communication and Startle Response. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2018; **38**: 5872–87.

157 Thevenon J, Souchay C, Seabold GK, *et al.* Heterozygous deletion of the LRFN2 gene is associated with working memory deficits. *Eur J Hum Genet EJHG* 2016; **24**: 911–8.

158 Inanobe A, Fujita A, Ito M, Tomoike H, Inageda K, Kurachi Y. Inward rectifier K+ channel Kir2.3 is localized at the postsynaptic membrane of excitatory synapses. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **282**: C1396-1403.

159 Yan X, Zhou H, Zhang J, *et al.* Molecular mechanism of inward rectifier potassium channel 2.3 regulation by tax-interacting protein-1. *J Mol Biol* 2009; **392**: 967–76.

160 Perozzo AM, Schwenk J, Kamalova A, Nakagawa T, Fakler B, Bowie D. GSG1L-containing AMPA receptor complexes are defined by their spatiotemporal expression, native interactome and allosteric sites. *Nat Commun* 2023; **14**: 6799.

161 Barlow JZ, Huntley GW. Developmentally regulated expression of Thy-1 in structures of the mouse sensory-motor system. *J Comp Neurol* 2000; **421**: 215–33.

162 Bradley JA, Ramirez G, Hagood JS. Roles and Regulation of Thy-1, a Context-Dependent Modulator of Cell Phenotype. *BioFactors Oxf Engl* 2009; **35**: 258–65.

163 Liang Z, Zhan Y, Shen Y, *et al.* The pseudokinase CaMKv is required for the activity-dependent maintenance of dendritic spines. *Nat Commun* 2016; **7**: 13282.

164 Orita S, Sasaki T, Naito A, *et al.* Doc2: a novel brain protein having two repeated C2-like domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **206**: 439–48.

165 Mesa-Infante V, Afonso-Oramas D, Salas-Hernández J, Rodríguez-Núñez J, Barroso-Chinea P. Long-term exposure to GDNF induces dephosphorylation of Ret, AKT, and ERK1/2, and is ineffective at protecting midbrain dopaminergic neurons in cellular models of Parkinson's disease. *Mol Cell Neurosci* 2022; **118**: 103684.

166 Saarma M, Sariola H. Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech* 1999; **45**: 292–302.

167 Takahashi M. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; **12**: 361–73.

168 Chourasia N, Ossó-Rivera H, Ghosh A, Von Allmen G, Koenig MK. Expanding the Phenotypic Spectrum of CACNA1H Mutations. *Pediatr Neurol* 2019; **93**: 50–5.

169 Stringer RN, Jurkovicova-Tarabova B, Huang S, *et al.* A rare CACNA1H variant associated with amyotrophic lateral sclerosis causes complete loss of Cav3.2 T-type channel activity. *Mol Brain* 2020; **13**: 33.

170 Ding L, Paszkowski-Rogacz M, Winzi M, *et al.* Systems Analyses Reveal Shared and Diverse Attributes of Oct4 Regulation in Pluripotent Cells. *Cell Syst* 2015; **1**: 141–51.

171 Lee J-H, You J, Dobrota E, Skalnik DG. Identification and characterization of a novel human PP1 phosphatase complex. *J Biol Chem* 2010; **285**: 24466–76.

172 Vanheer L, Song J, De Geest N, *et al.* Tox4 modulates cell fate reprogramming. *J Cell Sci* 2019; **132**: jcs232223.

173 Skariah G, Seimetz J, Norsworthy M, *et al.* Mov10 suppresses retroelements and regulates neuronal development and function in the developing brain. *BMC Biol* 2017; **15**: 54.

174 Dai C, Liang D, Li H, Sasaki M, Dawson TM, Dawson VL. Functional Identification of Neuroprotective Molecules. *PLoS ONE* 2010; **5**: e15008.

175 Homan CC, Kumar R, Nguyen LS, *et al.* Mutations in USP9X Are Associated with X-Linked Intellectual Disability and Disrupt Neuronal Cell Migration and Growth. *Am J Hum Genet* 2014; **94**: 470–8.

176 Stegeman S, Jolly LA, Premarathne S, *et al.* Loss of Usp9x disrupts cortical architecture, hippocampal development and TGFβ-mediated axonogenesis. *PloS One* 2013; **8**: e68287.

177 Horibata Y, Elpeleg O, Eran A, *et al.* EPT1 (selenoprotein I) is critical for the neural development and maintenance of plasmalogen in humans. *J Lipid Res* 2018; **59**: 1015–26.

178 Zhang S, Zhang H, Li H, Guo J, Wang J, Zhang L. Potential role of glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1 in the development of lung adenocarcinoma. *Aging* 2021; **13**: 7430–53.

179 Ain NU, Baroncelli M, Costantini A, *et al.* Novel form of rhizomelic skeletal dysplasia associated with a homozygous variant in GNPNAT1. *J Med Genet* 2021; **58**: 351–6.

180 Büttner N, Johnsen SA, Kügler S, Vogel T. Af9/Mllt3 interferes with Tbr1 expression through epigenetic modification of histone H3K79 during development of the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 7042–7.

181 Watts LP, Natsume T, Saito Y, *et al.* The RIF1-long splice variant promotes G1 phase 53BP1 nuclear bodies to protect against replication stress. *eLife* 2020; **9**: e58020.

182 Deng Y, Wan Q, Yan W. Integrin α5/ITGA5 Promotes The Proliferation, Migration, Invasion And Progression Of Oral Squamous Carcinoma By Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer Manag Res* 2019; **11**: 9609–20.

183 Fan Q-C, Tian H, Wang Y, Liu X-B. Integrin-α5 promoted the progression of oral squamous cell carcinoma and modulated PI3K/AKT signaling pathway. *Arch Oral Biol* 2019; **101**: 85–91.

184 Wang J, Chen Y, Zhang S, *et al.* ITGA5 Promotes Tumor Progression through the Activation of the FAK/AKT Signaling Pathway in Human Gastric Cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2022; **2022**: 8611306.

185 Yu M, Chu S, Fei B, Fang X, Liu Z. O-GlcNAcylation of ITGA5 facilitates the occurrence and development of colorectal cancer. *Exp Cell Res* 2019; **382**: 111464.

186 Karadurmus D, Rial D, De Backer J-F, Communi D, de Kerchove d'Exaerde A, Schiffmann SN. GPRIN3 Controls Neuronal Excitability, Morphology, and Striatal-Dependent Behaviors in the Indirect Pathway of the Striatum. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2019; **39**: 7513–28.

187 Mototani Y, Okamura T, Goto M, *et al.* Role of G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 3 (GRIN3) in β-arrestin 2-Akt signaling and dopaminergic behaviors. *Pflugers Arch* 2018; **470**: 937–47.

188 Ito Y, Nakajima K, Masubuchi Y, *et al.* Downregulation of low-density lipoprotein receptor class A domain-containing protein 4 (Ldlrad4) in the liver of rats treated with nongenotoxic hepatocarcinogen to induce transforming growth factor β signaling promoting cell proliferation and suppressing apoptosis in early hepatocarcinogenesis. *J Appl Toxicol JAT* 2020; **40**: 1467–79.

189 Kamada R, Kudoh F, Ito S, *et al.* Metal-dependent Ser/Thr protein phosphatase PPM family: Evolution, structures, diseases and inhibitors. *Pharmacol Ther* 2020; **215**: 107622.

190 Alsulami M, Munawar N, Dillon E, *et al.* SETD1A Methyltransferase Is Physically and Functionally Linked to the DNA Damage Repair Protein RAD18. *Mol Cell Proteomics MCP* 2019; **18**: 1428–36.

191 Wang S, Rhijn J-R van, Akkouh I, *et al.* Loss-of-function variants in the schizophrenia risk gene SETD1A alter neuronal network activity in human neurons through the cAMP/PKA pathway. *Cell Rep* 2022; **39**: 110790.

192 Ong-Pålsson E, Njavro JR, Wilson Y, *et al.* The β-Secretase Substrate Seizure 6–Like Protein (SEZ6L) Controls Motor Functions in Mice. *Mol Neurobiol* 2022; **59**: 1183–98.

193 Pigoni M, Wanngren J, Kuhn P-H, *et al.* Seizure protein 6 and its homolog seizure 6-like protein are physiological substrates of BACE1 in neurons. *Mol Neurodegener* 2016; **11**: 67.

194 Uneoka S, Kobayashi T, Numata-Uematsu Y, *et al.* A Case Series of Patients With MYBPC1 Gene Variants Featuring Undulating Tongue Movements as Myogenic Tremor. *Pediatr Neurol* 2023; **146**: 16–20.

195 Jiang S-N, Cao J-W, Liu L-Y, *et al.* Sncg, Mybpc1, and Parm1 Classify subpopulations of VIP-expressing interneurons in layers 2/3 of the somatosensory cortex. *Cereb Cortex N Y N 1991* 2023; **33**: 4293–304.

196 Seifert M, Przekopowitz M, Taudien S, *et al.* Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**: E546-555.

197 Liu C, Raab M, Gui Y, Rudd CE. Multi-functional adaptor SKAP1: regulator of integrin activation, the stop-signal, and the proliferation of T cells. *Front Immunol* 2023; **14**: 1192838.

198 Chu Y-D, Ho P-H, Chen W-T, *et al.* GALNT14 Genetic Variants Harbor Differential Prognostic Values Linking to Distinct Macrophage Cell Types in Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatocell Carcinoma* 2025; **12**: 1695–710.

199 Xi Q, Ma J. Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 14 (GALNT14) as a Chemosensitivity-Related Biomarker for Osteosarcoma. *J Oncol* 2023; **2023**: 1083423.

200 Liu PK, Salminen A, He YY, *et al.* Suppression of Ischemia-induced Fos Expression and AP-1 Activity by an Antisense Oligodeoxynucleotide to c-fos mRNA. *Ann Neurol* 1994; **36**: 566–76.

201 Preston GA, Lyon TT, Yin Y, *et al.* Induction of apoptosis by c-Fos protein. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 211–8.

202 Hoppstädter J, Ammit AJ. Role of Dual-Specificity Phosphatase 1 in Glucocorticoid-Driven Anti-inflammatory Responses. *Front Immunol* 2019; **10**: 1446.

203 Renoux F, Stellato M, Haftmann C, *et al.* The AP1 Transcription Factor Fosl2 Promotes Systemic Autoimmunity and Inflammation by Repressing Treg Development. *Cell Rep* 2020; **31**: 107826.

204 Xu K, Yin X, Zhou B, *et al.* FOSL2 promotes intertumoral infiltration of T cells and increases pathological complete response rates in locally advanced rectal cancer patients. *Cancer Lett* 2023; **562**: 216145.

205 Paul A, Tang TH, Ng SK. Interferon Regulatory Factor 9 Structure and Regulation. *Front Immunol* 2018; **9**: 1831.

206 Stokowska A, Olsson S, Holmegaard L, *et al.* Plasma C3 and C3a levels in cryptogenic and large-vessel disease stroke: associations with outcome. *Cerebrovasc Dis Basel Switz* 2011; **32**: 114–22.

207 Wu M, Shi Q, Duan S-L, *et al.* Insights into the Association Between QSER1 and M2 Macrophages and Remarkable Malignancy Characteristics in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Gen Med* 2022; **15**: 1765–75.

208 He Z, Yuan J, Qi P, Zhang L, Wang Z. Atorvastatin induces autophagic cell death in prostate cancer cells in vitro. *Mol Med Rep* 2015; **11**: 4403–8.

209 Yu C, Wang L, Lv B, *et al.* TMEM74, a lysosome and autophagosome protein, regulates autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **369**: 622–9.

210 Salzer U, Bacchelli C, Buckridge S, *et al.* Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. *Blood* 2009; **113**: 1967–76.

211 Gao L, Li P-P, Shao T-Y, *et al.* Neurotoxic role of interleukin-17 in neural stem cell differentiation after intracerebral hemorrhage. *Neural Regen Res* 2020; **15**: 1350–9.

212 Swardfager W, Winer DA, Herrmann N, Winer S, Lanctôt KL. Interleukin-17 in post-stroke neurodegeneration. *Neurosci Biobehav Rev* 2013; **37**: 436–47.

213 Tomomasa D, Hiejima E, Miyamoto T, *et al.* Recurrent tandem duplication of UNC13D in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3. *Clin Immunol Orlando Fla* 2022; **242**: 109104.

214 Dittmer S, Kovacs Z, Yuan SH, *et al.* TOX3 is a neuronal survival factor that induces transcription depending on the presence of CITED1 or phosphorylated CREB in the transcriptionally active complex. *J Cell Sci* 2011; **124**: 252–60.

215 Sahu SK, Fritz A, Tiwari N, *et al.* TOX3 regulates neural progenitor identity. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1859**: 833–40.

216 Carriba P, Jimenez S, Navarro V, *et al.* Amyloid-β reduces the expression of neuronal FAIM-L, thereby shifting the inflammatory response mediated by TNFα from neuronal protection to death. *Cell Death Dis* 2015; **6**: e1639.

217 Zou T, Sugimoto K, Zhang J, *et al.* Geniposide Alleviates Oxidative Stress of Mice With Depression-Like Behaviors by Upregulating Six3os1. *Front Cell Dev Biol* 2020; **8**: 553728.

218 López-Zambrano M, Rodriguez-Montesinos J, Crespo-Avilan GE, Muñoz-Vega M, Preissner KT. Thrombin Promotes Macrophage Polarization into M1-Like Phenotype to Induce Inflammatory Responses. *Thromb Haemost* 2020; **120**: 658–70.

219 Pinzon RT, Wijaya VO, Veronica V. The role of homocysteine levels as a risk factor of ischemic stroke events: a systematic review and meta-analysis. *Front Neurol* 2023; **14**: 1144584.

220 Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, *et al.* Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet* 2008; **40**: 569–71.

221 Kosmas CE, Bousvarou MD, Sourlas A, *et al.* Angiopoietin-Like Protein 3 (ANGPTL3) Inhibitors in the Management of Refractory Hypercholesterolemia. *Clin Pharmacol Adv Appl* 2022; **14**: 49–59.

222 Persson K, Heby O, Berger FG. The functional intronless S-adenosylmethionine decarboxylase gene of the mouse (Amd-2) is linked to the ornithine decarboxylase gene (Odc) on chromosome 12 and is present in distantly related species of the genus Mus. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 1999; **10**: 784–8.

223 Spaich S, Will RD, Just S, *et al.* F-box and leucine-rich repeat protein 22 is a cardiac-enriched F-box protein that regulates sarcomeric protein turnover and is essential for maintenance of contractile function in vivo. *Circ Res* 2012; **111**: 1504–16.

224 Hughes DC, Baehr LM, Driscoll JR, Lynch SA, Waddell DS, Bodine SC. Identification and characterization of Fbxl22, a novel skeletal muscle atrophy-promoting E3 ubiquitin ligase. *Am J Physiol Cell Physiol* 2020; **319**: C700–19.

225 Liu J, Feng M, Zhou J, Yang S, Shi Y, Li W. FBXL22, a circadian-regulated immune biomarker with pan-cancer prognostic value and therapeutic potential in prostate cancer. *Oncol Lett* 2025; **30**: 570.

226 Yang J, Kim E, Beltran C, Cho S. Corticosterone-Mediated Body Weight Loss Is an Important Catabolic Process for Poststroke Immunity and Survival. *Stroke* 2019; **50**: 2539–46.

227 Scherbakov N, Dirnagl U, Doehner W. Body weight after stroke: lessons from the obesity paradox. *Stroke* 2011; **42**: 3646–50.

228 Haley MJ, White CS, Roberts D, *et al.* Stroke Induces Prolonged Changes in Lipid Metabolism, the Liver and Body Composition in Mice. *Transl Stroke Res* 2020; **11**: 837–50.

229 Haley MJ, Mullard G, Hollywood KA, Cooper GJ, Dunn WB, Lawrence CB. Adipose tissue and metabolic and inflammatory responses to stroke are altered in obese mice. *Dis Model Mech* 2017; **10**: 1229–43.

230 Desgeorges MM, Devillard X, Toutain J, *et al.* Molecular mechanisms of skeletal muscle atrophy in a mouse model of cerebral ischemia. *Stroke* 2015; **46**: 1673–80.

231 Paddon-Jones D, Sheffield-Moore M, Cree MG, *et al.* Atrophy and impaired muscle protein synthesis during prolonged inactivity and stress. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 4836–41.

232 Coelho Junior HJ, Gambassi BB, Diniz TA, *et al.* Inflammatory Mechanisms Associated with Skeletal Muscle Sequelae after Stroke: Role of Physical Exercise. *Mediators Inflamm* 2016; **2016**: 3957958.

233 Feng T, Zhao C, Dong J, *et al.* The effect of unaffected side resistance training on upper limb function reconstruction and prevention of sarcopenia in stroke patients: a randomized controlled trial. *Sci Rep* 2024; **14**: 25330.

234 Springer J, Schust S, Peske K, *et al.* Catabolic signaling and muscle wasting after acute ischemic stroke in mice: indication for a stroke-specific sarcopenia. *Stroke* 2014; **45**: 3675–83.

235 Lourbopoulos A, Mamrak U, Roth S, *et al.* Inadequate food and water intake determine mortality following stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 2017; **37**: 2084–97.

236 Matsushita T, Nishioka S, Taguchi S, Yamanouchi A, Nakashima R, Wakabayashi H. Sarcopenic Obesity and Activities of Daily Living in Stroke Rehabilitation Patients: A Cross-Sectional Study. *Healthc Basel Switz* 2020; **8**: 255.

237 Ziaaldini MM, Koltai E, Csende Z, *et al.* Exercise training increases anabolic and attenuates catabolic and apoptotic processes in aged skeletal muscle of male rats. *Exp Gerontol* 2015; **67**: 9–14.

238 Rodriguez J, Fernández-Verdejo R, Pierre N, Priem F, Francaux M. Endurance Training Attenuates Catabolic Signals Induced by TNF-α in Muscle of Mice. *Med Sci Sports Exerc* 2016; **48**: 227–34.

239 Kinoshita K, Hamanaka G, Ohtomo R, *et al.* Mature Adult Mice With Exercise-Preconditioning Show Better Recovery After Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 2021; **52**: 1861–5.

240 Pierard M, Conotte S, Tassin A, *et al.* Interactions of exercise training and high-fat diet on adiponectin forms and muscle receptors in mice. *Nutr Metab* 2016; **13**: 75.

241 Ogawa T, Suenaga M. Elderly Patients after Stroke Increase Skeletal Muscle Mass by Exercise Therapy in Rehabilitation Wards. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2021; **30**: 105958.

242 Egan KJ, Janssen H, Sena ES, *et al.* Exercise reduces infarct volume and facilitates neurobehavioral recovery: results from a systematic review and meta-analysis of exercise in experimental models of focal ischemia. *Neurorehabil Neural Repair* 2014; **28**: 800–12.

243 Risedal A, Mattsson B, Dahlqvist P, Nordborg C, Olsson T, Johansson BB. Environmental influences on functional outcome after a cortical infarct in the rat. *Brain Res Bull* 2002; **58**: 315–21.

244 López-Cancio E, Ricciardi AC, Sobrino T, *et al.* Reported Prestroke Physical Activity Is Associated with Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Good Outcomes after Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc* 2017; **26**: 425–30.

245 Ricciardi AC, López-Cancio E, Pérez de la Ossa N, *et al.* Prestroke physical activity is associated with good functional outcome and arterial recanalization after stroke due to a large vessel occlusion. *Cerebrovasc Dis Basel Switz* 2014; **37**: 304–11.

246 He X, Shen X, Yang T, *et al.* Prevalence and risk factors of sarcopenia in patients with stroke: a systematic review and meta-analysis. *Neurosurg Rev* 2024; **48**: 6.

247 Cruz-Jentoft AJ, Sayer AA. Sarcopenia. *Lancet Lond Engl* 2019; **393**: 2636–46.

248 Yuan S, Larsson SC. Epidemiology of sarcopenia: Prevalence, risk factors, and consequences. *Metab - Clin Exp* 2023; **144**. DOI:10.1016/j.metabol.2023.155533.

249 Sato Y, Yoshimura Y, Abe T, Nagano F, Matsumoto A. Hospital-associated sarcopenia and the preventive effect of high energy intake along with intensive rehabilitation in patients with acute stroke. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif* 2023; **116**: 112181.

250 Lima OJF, Ribeiro J da S, Vasconcelos JDC, *et al.* Environmental enrichment changes the effects of prenatal and postnatal undernutrition on memory, anxiety traits, Bdnf and TrkB expression in the hippocampus of male adult rats. *Behav Brain Res* 2024; **460**: 114817.

251 Butsing N, Zauszniewski JA, Ruksakulpiwat S, Griffin MTQ, Niyomyart A. Association between post-stroke depression and functional outcomes: A systematic review. *PLOS ONE* 2024; **19**: e0309158.

252 Wang Z-Y, Deng Y-L, Zhou T-Y, *et al.* The effects of exercise interventions on depressive symptoms in stroke patients: a systematic review and meta-analysis. *Front Physiol* 2025; **16**: 1492221.

253 Manzo R, Gallardo-Becerra L, Díaz de León-Guerrero S, *et al.* Environmental Enrichment Prevents Gut Dysbiosis Progression and Enhances Glucose Metabolism in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Int J Mol Sci* 2024; **25**: 6904.

254 Takeuchi N, Chuma T, Matsuo Y, Watanabe I, Ikoma K. Repetitive transcranial magnetic stimulation of contralesional primary motor cortex improves hand function after stroke. *Stroke* 2005; **36**: 2681–6.

255 Brown JA, Lutsep HL, Weinand M, Cramer SC. Motor cortex stimulation for the enhancement of recovery from stroke: a prospective, multicenter safety study. *Neurosurgery* 2006; **58**: 464–73.

256 Cheng MY, Aswendt M, Steinberg GK. Optogenetic Approaches to Target Specific Neural Circuits in Post-stroke Recovery. *Neurother J Am Soc Exp Neurother* 2016; **13**: 325–40.

257 Zhu X, Jiao L, Chen Q, Kuang Z, Shang J. Effects of Transcranial Magnetic Stimulation on Patients of Poststroke Upper Extremity Motor Impairment: A Randomized Controlled Trial. *Am J Phys Med Rehabil* 2026; **105**: 20.

258 Pin-Barre C, Laurin J. Physical Exercise as a Diagnostic, Rehabilitation, and Preventive Tool: Influence on Neuroplasticity and Motor Recovery after Stroke. *Neural Plast* 2015; **2015**: 608581.

259 Zeng J, Bao T, Yang K, *et al.* The mechanism of microglia-mediated immune inflammation in ischemic stroke and the role of natural botanical components in regulating microglia: A review. *Front Immunol* 2022; **13**: 1047550.

260 Zhang S, Zhang Y, Liu H, *et al.* Enriched environment remodels the central immune environment and improves the prognosis of acute ischemic stroke in elderly mice with chronic ischemia. *Front Immunol* 2023; **14**: 1114596.

261 Guo Y-S, Yuan M, Han Y, Shen X-Y, Gao Z-K, Bi X. Effects of enriched environment on microglia and functional white matter recovery in rats with post stroke cognitive impairment. *Neurochem Int* 2022; **154**: 105295.

262 Buchhold B, Mogoanta L, Suofu Y, *et al.* Environmental enrichment improves functional and neuropathological indices following stroke in young and aged rats. *Restor Neurol Neurosci* 2007; **25**: 467–84.

263 Hase Y, Craggs L, Hase M, *et al.* Effects of environmental enrichment on white matter glial responses in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *J Neuroinflammation* 2017; **14**: 81.

264 Li Z, Song Y, He T, *et al.* M2 microglial small extracellular vesicles reduce glial scar formation via the miR-124/STAT3 pathway after ischemic stroke in mice. *Theranostics* 2021; **11**: 1232–48.

265 Adams KL, Gallo V. The diversity and disparity of the glial scar. *Nat Neurosci* 2018; **21**: 9–15.

266 Clain J, Couret D, Bringart M, *et al.* Metabolic disorders exacerbate the formation of glial scar after stroke. *Eur J Neurosci* 2024; **59**: 3009–29.

267 Xu S, Lu J, Shao A, Zhang JH, Zhang J. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. *Front Immunol* 2020; **11**: 294.

268 Clain J, Couret D, Bringart M, *et al.* Metabolic disorders exacerbate the formation of glial scar after stroke. *Eur J Neurosci* 2024; **59**: 3009–29.

269 Duan W, Zhang Y-P, Hou Z, *et al.* Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Mol Neurobiol* 2016; **53**: 1637–47.

270 García Juárez AM, Carrillo González NJ, Campos-Ordoñez T, Gasca Martínez Y, Gudiño-Cabrera G. Neuronal splicing regulator RBFOX3 (NeuN) distribution and organization are modified in response to monosodium glutamate in rat brain at postnatal day 14. *Acta Histochem* 2024; **126**: 152207.

271 Dredge BK, Jensen KB. NeuN/Rbfox3 nuclear and cytoplasmic isoforms differentially regulate alternative splicing and nonsense-mediated decay of Rbfox2. *PloS One* 2011; **6**: e21585.

272 Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res* 2005; **79**: 295–302.

273 Ünal-Çevik I, Kılınç M, Gürsoy-Özdemir Y, Gurer G, Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res* 2004; **1015**: 169–74.

274 Unal-Cevik I, Kilinç M, Gürsoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res* 2004; **1015**: 169–74.

275 Yu P, McKinney EC, Kandasamy MM, Albert AL, Meagher RB. Characterization of brain cell nuclei with decondensed chromatin. *Dev Neurobiol* 2015; **75**: 738–56.

276 Haley MJ, Krishnan S, Burrows D, *et al.* Acute high-fat feeding leads to disruptions in glucose homeostasis and worsens stroke outcome. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 2019; **39**: 1026–37.

277 Tulsulkar J, Nada SE, Slotterbeck BD, McInerney MF, Shah ZA. Obesity and hyperglycemia lead to impaired post-ischemic recovery after permanent ischemia in mice. *Obes Silver Spring Md* 2016; **24**: 417–23.

278 Li J, Sun N, Hu S, Zuo Z. Chronic high fat diet-induced cerebrovascular remodeling impairs recovery of blood flow after cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 2025; **45**: 1116–29.

279 Maysami S, Haley MJ, Gorenkova N, Krishnan S, McColl BW, Lawrence CB. Prolonged diet-induced obesity in mice modifies the inflammatory response and leads to worse outcome after stroke. *J Neuroinflammation* 2015; **12**: 140.

280 Brunelli S, Giannella E, Bizzaglia M, De Angelis D, Sancesario GM. Secondary neurodegeneration following Stroke: what can blood biomarkers tell us? *Front Neurol* 2023; **14**: 1198216.

281 Ladwig A, Rogall R, Hucklenbroich J, *et al.* Osteopontin Attenuates Secondary Neurodegeneration in the Thalamus after Experimental Stroke. *J Neuroimmune Pharmacol Off J Soc NeuroImmune Pharmacol* 2019; **14**: 295–311.

282 Han Y, Yuan M, Guo Y-S, Shen X-Y, Gao Z-K, Bi X. The role of enriched environment in neural development and repair. *Front Cell Neurosci* 2022; **16**: 890666.

283 Ulloa Severino FP, Lawal OO, Sakers K, *et al.* Training-induced circuit-specific excitatory synaptogenesis in mice is required for effort control. *Nat Commun* 2023; **14**: 5522.

284 Zanini G, De Gaetano A, Selleri V, *et al.* Mitochondrial DNA and Exercise: Implications for Health and Injuries in Sports. *Cells* 2021; **10**: 2575.

285 Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 2012; **76**: 116–29.

286 Klinkenberg I, Sambeth A, Blokland A. Acetylcholine and attention. *Behav Brain Res* 2011; **221**: 430–42.

287 Perry E, Walker M, Grace J, Perry R. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci* 1999; **22**: 273–80.

288 Brain tissue expression of DRD1 - Summary - The Human Protein Atlas. https://www.proteinatlas.org/ENSG00000184845-DRD1/brain?utm_source=chatgpt.com (accessed Sept 4, 2025).

289 Ko JH, Strafella AP. Dopaminergic neurotransmission in the human brain: new lessons from perturbation and imaging. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry* 2012; **18**: 149–68.

290 Yan Y, Jiang W, Liu L, *et al.* Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell* 2015; **160**: 62–73.

291 Cheng Z-Y, Hu Y-H, Xia Q-P, Wang C, He L. DRD1 agonist A-68930 improves mitochondrial dysfunction and cognitive deficits in a streptozotocin-induced mouse model. *Brain Res Bull* 2021; **175**: 136–49.

292 Andreska T, Lüningschrör P, Wolf D, *et al.* DRD1 signaling modulates TrkB turnover and BDNF sensitivity in direct pathway striatal medium spiny neurons. *Cell Rep* 2023; **42**: 112575.

293 Gower A, Tiberi M. The Intersection of Central Dopamine System and Stroke: Potential Avenues Aiming at Enhancement of Motor Recovery. *Front Synaptic Neurosci* 2018; **10**: 18.

294 Saalbach A, Anderegg U. Thy-1: more than a marker for mesenchymall cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2019; **33**: 6689–96.

295 Loui J, Krügel U, Winkler U, *et al.* Neuronal THY1 Signaling Maintains Astrocytes in a Quiescent State. *Glia* 2025; published online Sept 11. DOI:10.1002/glia.70083.

296 Rege TA, Hagood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2006; **20**: 1045–54.

297 Dordoe C, Chen K, Huang W, *et al.* Roles of Fibroblast Growth Factors and Their Therapeutic Potential in Treatment of Ischemic Stroke. *Front Pharmacol* 2021; **12**: 671131.

298 Mei L, Chen Y, Chen P, *et al.* Fibroblast growth factor 7 alleviates myocardial infarction by improving oxidative stress via PI3Kα/AKT-mediated regulation of Nrf2 and HXK2. *Redox Biol* 2022; **56**: 102468.

299 Oprişoreanu A-M, Smith HL, Arya S, *et al.* Interaction of Axonal Chondrolectin with Collagen XIXa1 Is Necessary for Precise Neuromuscular Junction Formation. *Cell Rep* 2019; **29**: 1082-1098.e10.

300 Shi J, Chen X, Li H, *et al.* Neuron-autonomous transcriptome changes upon ischemia/reperfusion injury. *Sci Rep* 2017; **7**: 5800.

301 Philippidou P, Dasen JS. Hox Genes: Choreographers in Neural Development, Architects of Circuit Organization. *Neuron* 2013; **80**: 10.1016/j.neuron.2013.09.020.

302 Nagata K, Takahashi M, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Saido TC. Distinct functional consequences of ECEL1/DINE missense mutations in the pathogenesis of congenital contracture disorders. *Acta Neuropathol Commun* 2017; **5**: 83.

303 Manco C, Righi D, Primiano G, *et al.* Peripherin, A New Promising Biomarker in Neurological Disorders. *Eur J Neurosci* 2025; **61**: e70030.

304 Keddie S, Smyth D, Keh RYS, *et al.* Peripherin is a biomarker of axonal damage in peripheral nervous system disease. *Brain J Neurol* 2023; **146**: 4562–73.

305 Krenn M, Knaus A, Westphal DS, *et al.* Biallelic mutations in PIGP cause developmental and epileptic encephalopathy. *Ann Clin Transl Neurol* 2019; **6**: 968–73.

306 Zheng C, Chen D, Zhang Y, *et al.* FAM19A1 is a new ligand for GPR1 that modulates neural stem-cell proliferation and differentiation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2018; : fj201800020RRR.

307 Hu Y, Zheng Y, Wu Y, Ni B, Shi S. Imbalance between IL-17A-producing cells and regulatory T cells during ischemic stroke. *Mediators Inflamm* 2014; **2014**: 813045.

308 Lambertsen KL, Finsen B, Clausen BH. Post-stroke inflammation-target or tool for therapy? *Acta Neuropathol (Berl)* 2019; **137**: 693–714.

309 Kwon HS, Koh S-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 2020; **9**: 42.

310 Gill D, Veltkamp R. Dynamics of T cell responses after stroke. *Curr Opin Pharmacol* 2016; **26**: 26–32.

311 Weizmann Institute of Science. CD83 Gene - CD83 Molecule. 2024. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD83.

312 Zhang D, Ren J, Luo Y, *et al.* T Cell Response in Ischemic Stroke: From Mechanisms to Translational Insights. *Front Immunol* 2021; **12**: 707972.

313 Ruhnau J, Schulze J, von Sarnowski B, *et al.* Reduced Numbers and Impaired Function of Regulatory T Cells in Peripheral Blood of Ischemic Stroke Patients. *Mediators Inflamm* 2016; **2016**: 2974605.

314 Liu C, Raab M, Gui Y, Rudd CE. Multi-functional adaptor SKAP1: regulator of integrin activation, the stop-signal, and the proliferation of T cells. *Front Immunol* 2023; **14**: 1192838.

315 Weizmann Institute of Science. SKAP1 Gene - Src Kinase Associated Phosphoprotein 1. 2024. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SKAP1.

316 Morimoto K, Sano H, Takahashi M, Takahashi R, Nakajima K. Comprehensive analysis of immunoglobulin expression in the mouse brain from embryonic to adult stages. *J Neuroinflammation* 2025; **22**: 153.

317 Horibata Y, Elpeleg O, Eran A, *et al.* EPT1 (selenoprotein I) is critical for the neural development and maintenance of plasmalogen in humans. *J Lipid Res* 2018; **59**: 1015–26.

318 Isik FI, Galper J, Pickford R, Dzamko N, Fu Y, Kim WS. Dysregulation of SELENOI Is Associated with TDP-43 Neuropathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells* 2025; **14**: 1457.

319 Zhang Y, Roh YJ, Han S-J, *et al.* Role of Selenoproteins in Redox Regulation of Signaling and the Antioxidant System: A Review. *Antioxidants* 2020; **9**: 383.

320 C-Fos - an overview | ScienceDirect Topics. https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/c-fos (accessed Jan 27, 2026).

321 Chen X, Shen J, Wang Y, *et al.* Up-regulation of c-Fos associated with neuronal apoptosis following intracerebral hemorrhage. *Cell Mol Neurobiol* 2015; **35**: 363–76.

322 Perrin-Terrin A-S, Jeton F, Pichon A, *et al.* The c-FOS Protein Immunohistological Detection: A Useful Tool As a Marker of Central Pathways Involved in Specific Physiological Responses In Vivo and Ex Vivo. *J Vis Exp JoVE* 2016; published online April 25. DOI:10.3791/53613.

323 Lin S, Huang XF. Altered hypothalamic c-Fos-like immunoreactivity in diet-induced obese mice. *Brain Res Bull* 1999; **49**: 215–9.

324 Valdivia S, Patrone A, Reynaldo M, Perello M. Acute high fat diet consumption activates the mesolimbic circuit and requires orexin signaling in a mouse model. *PloS One* 2014; **9**: e87478.

325 Rigillo G, Vilella A, Benatti C, *et al.* LPS-induced histone H3 phospho(Ser10)-acetylation(Lys14) regulates neuronal and microglial neuroinflammatory response. *Brain Behav Immun* 2018; **74**: 277–90.

326 Babaei P, Faraji N, Eyvani K. c-Fos Expression Differentially Acts in the Healthy Brain Compared with Alzheimer's Disease. *Gene Expr* 2025; **24**: 209–18.

327 Brain tissue expression of FOSL2 - Summary - The Human Protein Atlas. https://www.proteinatlas.org/ENSG00000075426-FOSL2/brain (accessed Jan 27, 2026).

328 Chen H-Z, Guo S, Li Z-Z, *et al.* A critical role for interferon regulatory factor 9 in cerebral ischemic stroke. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2014; **34**: 11897–912.

329 Yang P, Zhu Z, Zang Y, *et al.* Increased Serum Complement C3 Levels Are Associated With Adverse Clinical Outcomes After Ischemic Stroke. *Stroke* 2021; **52**: 868–77.

330 Ma Y, Liu Y, Zhang Z, Yang G-Y. Significance of Complement System in Ischemic Stroke: A Comprehensive Review. *Aging Dis* 2019; **10**: 429.

331 Zhu H, Hu S, Li Y, *et al.* Interleukins and Ischemic Stroke. *Front Immunol* 2022; **13**: 828447.

332 Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, *et al.* Interleukin-17 in Chronic Inflammatory Neurological Diseases. *Front Immunol* 2020; **11**. DOI:10.3389/fimmu.2020.00947.

333 Şekerdağ E, Solaroğlu I, Gürsoy-Özdemir Y. Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and Cellular Treatment Options. *Curr Neuropharmacol* 2018; **16**: 1396.

334 Noetel M, Sanders T, Gallardo-Gómez D, *et al.* Effect of exercise for depression: systematic review and network meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2024; **384**: e075847.

335 Chen R, Guo Y, Kuang Y, Zhang Q. Effects of home-based exercise interventions on post-stroke depression: A systematic review and network meta-analysis. *Int J Nurs Stud* 2024; **152**: 104698.

336 Li C, Zhao M, Sun T, *et al.* Treatment effect of exercise training on post-stroke depression in middle-aged and older adults: A meta-analysis. *Int J Geriatr Psychiatry* 2022; **37**. DOI:10.1002/gps.5798.

337 Ye F, Garton HJL, Hua Y, Keep RF, Xi G. The role of thrombin in brain injury after hemorrhagic and ischemic stroke. *Transl Stroke Res* 2020; : 10.1007/s12975.

338 Tikka A, Jauhiainen M. The role of ANGPTL3 in controlling lipoprotein metabolism. *Endocrine* 2016; **52**: 187–93.

339 Memme JM, Erlich AT, Phukan G, Hood DA. Exercise and mitochondrial health. *J Physiol* 2021; **599**: 803–17.

340 Kadenbach B. Regulation of cytochrome c oxidase contributes to health and optimal life. *World J Biol Chem* 2020; **11**: 52.

341 Cardanho-Ramos C, Morais VA. Mitochondrial Biogenesis in Neurons: How and Where. *Int J Mol Sci* 2021; **22**: 13059.

342 Puig B, Brenna S, Magnus T. Molecular Communication of a Dying Neuron in Stroke. *Int J Mol Sci* 2018; **19**: 2834.

343 English K, Shepherd A, Uzor N-E, Trinh R, Kavelaars A, Heijnen CJ. Astrocytes rescue neuronal health after cisplatin treatment through mitochondrial transfer. *Acta Neuropathol Commun* 2020; **8**: 36.

344 Huang P-J, Kuo C-C, Lee H-C, *et al.* Transferring Xenogenic Mitochondria Provides Neural Protection Against Ischemic Stress in Ischemic Rat Brains. *Cell Transplant* 2016; **25**: 913–27.

345 Silachev DN, Plotnikov EY, Pevzner IB, *et al.* The Mitochondrion as a Key Regulator of Ischaemic Tolerance and Injury. *Heart Lung Circ* 2014; **23**: 897–904.

346 Langley MR, Yoon H, Kim HN, *et al.* High fat diet consumption results in mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and oligodendrocyte loss in the central nervous system. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020; **1866**: 165630.

347 Cavaliere G, Trinchese G, Penna E, *et al.* High-Fat Diet Induces Neuroinflammation and Mitochondrial Impairment in Mice Cerebral Cortex and Synaptic Fraction. *Front Cell Neurosci* 2019; **13**: 509.

348 Chaudhry R, Varacallo MA. Biochemistry, Glycolysis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482303/ (accessed Jan 27, 2026).

349 Deshpande OA, Mohiuddin SS. Biochemistry, Oxidative Phosphorylation. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553192/ (accessed Jan 27, 2026).

350 Wang X, Zhang X-Y, Liao N-Q, He Z-H, Chen Q-F. Identification of ribosome biogenesis genes and subgroups in ischaemic stroke. *Front Immunol* 2024; **15**: 1449158.

351 Fusco CM, Desch K, Dörrbaum AR, *et al.* Neuronal ribosomes exhibit dynamic and context-dependent exchange of ribosomal proteins. *Nat Commun* 2021; **12**: 6127.

352 Fusco CM, Staab A, Bourke AM, *et al.* Neuronal processes contain the essential components for the late steps of ribosome biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2025; **122**: e2502424122.

353 Slomnicki LP, Pietrzak M, Vashishta A, *et al.* Requirement of Neuronal Ribosome Synthesis for Growth and Maintenance of the Dendritic Tree. *J Biol Chem* 2016; **291**: 5721–39.

354 Reddy I, Yadav Y, Dey CS. Cellular and Molecular Regulation of Exercise-A Neuronal Perspective. *Cell Mol Neurobiol* 2023; **43**: 1551–71.

355 Quan H, Koltai E, Suzuki K, *et al.* Exercise, redox system and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020; **1866**: 165778.

356 Radak Z, Suzuki K, Higuchi M, Balogh L, Boldogh I, Koltai E. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. *Free Radic Biol Med* 2016; **98**: 187–96.

357 Biever A, Glock C, Tushev G, *et al.* Monosomes actively translate synaptic mRNAs in neuronal processes. *Science* 2020; **367**: eaay4991.

358 Kasner SE. Clinical interpretation and use of stroke scales. *Lancet Neurol* 2006; **5**: 603–12.

359 Borland E, Edgar C, Stomrud E, Cullen N, Hansson O, Palmqvist S. Clinically Relevant Changes for Cognitive Outcomes in Preclinical and Prodromal Cognitive Stages. *Neurology* 2022; **99**: e1142–53.

360 Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, *et al.* Update of the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable Preclinical Recommendations. *Stroke J Cereb Circ* 2009; **40**: 2244–50.

361 Uhl EW, Warner NJ. Mouse Models as Predictors of Human Responses: Evolutionary Medicine. *Curr Pathobiol Rep* 2015; **3**: 219.

362 Sundberg JP, Schofield PN. Living inside the box: environmental effects on mouse models of human disease. *Dis Model Mech* 2018; **11**: dmm035360.

7. ANHANG

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Chronologische zelluläre und molekulare Folgen eines ischämischen Schlaganfalls
Abb. 2 Stimulationstypen im EE im Tiermodell
Abb. 3 Makroskopische, molekulare und epigenetische Effekte von Enriched Environment
Abb. 4 Interventionen und berichtete Outcomes von Enriched Environments in der Schlaganfallrehabilitation
Abb. 5 Übersicht der durchgeführten Experimente
Abb. 6 Gruppeneinteilung der Versuchstiere
Abb. 7 Versuchsaufbau: Enriched Environment- und Standardkäfige
Abb. 8 Experimenteller Zeitplan des Tiermodells
Abb. 9 Neuroscore – Übersicht der Testkomponenten
Abb. 10 Punktesystem des Neuroscore
Abb. 11 Kleinhirnentnahme und RNA-Extraktion
Abb. 12 Phänotyp nach sechs Wochen EE- und Diätintervention
Abb. 13 Gewichtsverlust nach Schlaganfall in Abhängigkeit von Umgebung und Diät
Abb. 14 Neuroscore nach Schlaganfall unter unterschiedlichen Umwelt- und Diätbedingungen
Abb. 15 Zellverteilung von Mikroglia und Neuronen im Infarkt- und Periinfarktareal.
Abb. 16 Sample Distance Plot der RNA-Sequenzierungsproben
Abb. 17 Volcano Plots der differentiell exprimierten Gene zwischen CC- und EE-Gruppen
Abb. 18 KEGG-Enrichment-Analyse für EE im Vergleich zu CC
Abb. 19 KEGG-Pathways Oxidative Phosphorylation und Ribosom unter EE
Abb. 20 GSEA-GOCC-Analyse: ribosomale, mitochondriale und neuronale Strukturen unter EE angereichert
Abb. 21 Heatmap der mitochondrialen Gene in den vier Versuchsgruppen

7.2. Tabellenverzeichnis

Tbl. 1 Verwendete Substanzen, Lösungen und Chemikalien
Tbl. 2 Verwendete Geräte
Tbl. 3 Eingesetzte Software
Tbl. 4 Verwendete Primärantikörper
Tbl. 5 Verwendete Sekundärantikörper
Tbl. 6 Fluoreszenzfarbstoff
Tbl. 7 Apeglm- und ashr-Methoden im Vergleich EE NCD vs. CC NCD
Tbl. 8 Apeglm- und ashr-Methoden im Vergleich EE HFD vs. CC HFD
Tbl. 9 In EE hochregulierte Gene unter NCD und HFD
Tbl. 10 In EE herunterregulierte Gene unter NCD und HFD
Tbl. 11 Gene der EE-Gruppe für neuronale Entwicklung, synaptische Integrität und neuronales Überleben
Tbl. 12 Gene der EE-Gruppe für pro-apoptotische, pro-inflammatorische und immunregulatorische Signalwege
Tbl. 13 In EE hochregulierte Gene mit anti-apoptotischer Funktion
Tbl. 14 In EE hochregulierte mitochondriale Gene
Tbl. 15 Blutgerinnungsbezogene Gene, die in EE herunterreguliert sind
Tbl. 16 Stoffwechselgene, die durch EE moduliert werden
Tbl. 17 Muskelspezifische Gene und Regulatoren der Muskelfunktion
Tbl. 18 Sonstige Gene ohne eindeutige funktionelle Zuordnung
Tbl. 19 Zusammenfassung der KEGG-Signalwege im Vergleich EE vs. CC unter NCD und HFD

8. Vorabveröffentlichungen

Teile der in dieser Dissertation dargestellten Daten und Ergebnisse wurden vorab in einer wissenschaftlichen Publikation eingereicht, die sich derzeit im Revisionsprozess befindet.

Ladwig A, Cremer AL, Romer J, Zimmermann V, Brandt C, Blaschke S, Orschel C, Orschel C, Schäfer M, Rueger MA, Stürner KH, Fink GR, Schroeter M, Backes H. High fat diet-induced hedonic control of feeding prevents adjustment of caloric intake to reduced energy expenditure. Cell Reports. 2026. In Revision.