

DISS. ETH NO. 23662

The functional and comparative characterisation of adult neurogenesis and plasticity in the hippocampus

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Roelof Maarten van Dijk

Master of Science

Radboud University Nijmegen

born on *26.10.1986*

citizen of the Netherlands

accepted on the recommendation of

Prof. David P. Wolfer

PD Dr. Irmgard Amrein

Lutz Slomianka, cand. scient.

Dr. Stanley E. Lazic

2016

SUMMARY

The hippocampus is one of the most studied structures of the brain, it is connected to a wide range of brain regions and is functionally implied in an equally wide range of behavioural tasks. In addition, the realisation that the hippocampus is one of the very few regions where new neurons are born throughout life has added an extra level of complexity to understanding the hippocampus. In this thesis several aspects of hippocampal morphology, plasticity and functioning are investigated.

The hippocampus is known to have strong ties to emotional behaviour and over the last decade research has focussed on the possible role of adult neurogenesis in major depressive disorder (MDD). Interest spiked after Santarelli et al (2003) showed the necessity of adult neurogenesis in anti-depressant induced behavioural changes. This notion, as it often occurs in adult neurogenesis research, has been disputed in subsequent studies. Recently a new theory on the functioning of SSRIs (selective serotonin reuptake inhibitors) has been proposed. In this theory SSRI treatment does not affect behavioural outcome directly but rather increases neural plasticity. Increased plasticity then leads to a positive outcome in a supportive environment while worsening symptoms in a stressful environment. We investigated the effect of SSRI treatment, the living environment and the interaction between the two on hippocampal volume and the proliferation and differentiation of the new-born neurons in the hippocampus. Overall very little differential outcomes were observed, i.e. volume or cell numbers changing in different directions in the opposing environments following SSRI treatment. Stress had a uniformly negative effect on all volume measurements in the hippocampus but did not affect neurogenic cell numbers, resulting in an increased cell density, fitting with what is known in human MDD patients. The only observed effect of SSRI treatment is an overall decrease in the number of proliferating cells. Neurogenic cell numbers were otherwise, surprisingly, not affected by stress or SSRI treatment. A possible reason for this lack of effect is that all animals in our study were subjected to stress before being divided into a stress and non-stressed group, possibly affecting baseline neurogenesis levels.

A second topic is the comparative study of the hippocampus and adult neurogenesis. Different species show distinct base line levels of adult neurogenesis, the current hypothesis on these differences is that these differences originate from a difference in habitat and the specific ecological challenges each species is faced with. This hypothesis is further explored in this thesis. First, adult neurogenesis was investigated in eight rodent species from two distinct climates, four species from the temperate climate of South African and four from the colder climate of Europe and Russia. While from overlapping phylogenetic families, the two groups show distinct differences in their level of new-born

neurons based on their habitat. Second, the maturation and spatial distribution of the adult neurogenesis was characterized in the common marmoset. While distribution is similar to that of rodents, the maturation of new born neurons shows key differences. Overall maturation is prolonged and, in contrast to rodents, different maturation stages show little to no overlap. This extended maturation results in large distinct CR+ and DCX+ cell populations, something not seen in any other described species and potentially indicative of a specific primate feature of adult neurogenesis. Thirdly in a more extensive comparative study the principal cell populations of the hippocampus were compared in 20 species or strains and neurogenesis populations in 12 species or strains. Using a correspondence analysis we were able to compare the interrelationships between the different cell populations independent of large size differences between the species. The distribution of the principal cell populations are largely determined by phylogeny, where the CA3 and hilus are strong separators between phylogenetic orders. Rodents cluster according to their shared relatively large CA3 while non-rodent species are on the opposite side of the spectrum showing a small CA3 but larger hilus. When the number of proliferating cells and new-born neurons are included in the analyses each shows to be a unique separator between species within the rodent group. This indicates several interesting things, neurogenesis shows more variation within a phylogenetic group, suggesting to be more plastic than the principal hippocampal cell populations and the balance between the proliferation versus differentiation of new-born neurons differs substantially between species, suggesting different neurogenic strategies, something also reflected in the species-specific maturation stages of the common marmoset. Overall our results suggests that adult neurogenesis may provide an ontogenetic mechanism to adapt faster to changes in the ecological niche compared to the phylogenetic time scales that mediate changes in the principal hippocampal cell populations.

The third and last topic is the behavioural function of adult neurogenesis. In a large scale phenotyping experiment we analysed a large number of behavioural variables in two strains of mice, DBA and C57BL/6, at two ages, 3 and 5 months, for an association with adult neurogenesis. The initial aim of the study focussed on the suggested links between neurogenesis and anxiety and impulsive behaviour. However no relationships were found and instead a strong association was found with the way the animals explored the novel experimental environment. More specifically this effect was only observed in the older of the two tested age groups. The hippocampus is known to be involved in the way animals react to a novel environment, but this is not usually linked to adult neurogenesis. These results can potentially explain discrepancies seen in the adult neurogenesis – behaviour studies. In classical behaviour experiments animals are taken from their home cage to be tested in a, for the animal, novel testing environment. Differences in neurogenesis would then correlate with behavioural performance in a novel environment, which can be mistaken for a correlation with the tested behaviour. Such

effects have indeed been described in the literature, where an effect of neurogenesis is only observed when the experimental set up was novel to the animal. In the larger context of animals in the wild a difference in the way a novel environment is explored can have a major effect on survival and can be reflective of different strategies seen in different species.

ZUSAMMENFASSUNG

In der Gehirnforschung gehört der Hippocampus zu den meist untersuchten Regionen. Der Hippocampus ist involviert in unzählige Verhaltensfunktionen und kann, als eine von wenigen Regionen im Gehirn, im Laufe des Lebens neue Neuronen generieren (Neurogenese). In dieser Thesis werden drei Aspekte des Hippocampus von verschiedenen Blickwinkeln untersucht, nämlich die Morphologie, die Plastizität und die Funktion des Hippocampus.

Der Hippocampus steuert und beeinflusst emotionales Verhalten. Daher lag ein Fokus der Hippocampusforschung in den letzten Jahrzehnten auf der möglichen Rolle von adulter Neurogenese in depressiven Störungen. Die Studie von Santarelli et al (2003) zeigte, dass die positiven Verhaltensveränderungen durch einer Antidepressiva-Therapie durch die neugebildeten Neurone herbeigeführt wird. Dieser Befund, wie so oft in der Neurogenese-Forschung, gab Anlass zu heftigen Debatten in nachfolgenden Studien. Neue Theorien über selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (SSRI = selective serotonin reuptake inhibitor), ein Mittel zur Behandlung von depressiven Störungen, besagen nun allerdings, dass SSRIs nicht direkt das Verhalten beeinflussen, sondern eher zu einer Erhöhung der neuronalen Plastizität führen. Diese erhöhte Plastizität wiederum führt zu einem positiven Resultat in einem unterstützten Umfeld, während es in einem stressvollen Umfeld zu einer Verschlechterung kommt und die negativen Symptome im schlimmsten Fall sogar verstärkt. Wir haben in Mäusen den Effekt von SSRI Behandlungen, dem Umfeld, sowie deren Wechselwirkung auf das Hippocampusvolumen und auf die Proliferation und Differenzierung von neugeborenen Neuronen untersucht. Wir fanden einen allgemeinen Rückgang von proliferierenden Zellen nach einer SSRI Behandlung. Die jungen Neurone wurden weder durch Stress noch durch die SSRI Behandlung beeinflusst. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass alle Tiere unserer Studie bereits eine gewisse Art von Stress erfahren haben, bevor sie in eine Stress und eine nicht-Stress Gruppe unterteilt wurden. Dies hat womöglich das Grundniveau der Neurogenese beeinflusst. Stress hatte jedoch einen konstant negativen Effekt auf alle Volumenmessungen im Hippocampus, ohne die Anzahl der neugeborenen Neuronen zu beeinflussen, was zu einer erhöhten Zelldichte führte.

Ein zweites Thema dieser Thesis ist die vergleichende Studie des Hippocampus und adulter Neurogenese. Verschiedene Tierarten zeigen unterschiedliche Grundniveaus von adulter Neurogenese. Die zugrundeliegende Hypothese bezieht sich auf die Unterschiede im Lebensraum und der spezifischen Herausforderungen durch die Umwelt, welchen sich jede Art stellen muss. Um die Hypothese zu testen, wurde die Neurogenese in acht Nagetierarten aus zwei unterschiedlichen Klimazonen untersucht: vier Arten aus einem gemässigten Klima in Südafrika und vier Arten aus einem

kalten Klima in Europa und Russland. Obwohl sich die Arten aus den Klimazonen phylogenetisch überschneiden, zeigen die zwei Gruppen deutliche habitatsspezifische Unterschiede in der Anzahl von neugeborenen Neuronen. Weiter wurde die Zellreifung und die räumliche Verteilung von adult geborenen Neuronen im Weissbüschelaffen charakterisiert. Obwohl die Verteilung ähnlich ist wie die in Nagetieren, zeigt die Reifung von neugeborenen Neuronen deutliche Unterschiede auf. Im Weissbüschelaffen ist die Reifung verlangsamt, und im Gegensatz zu Nagetieren zeigen die einzelnen Phasen der Zellreifung wenig bis keine Überschneidungen, wodurch Zellpopulationen entstehen, die in keiner anderen Art beschrieben sind und auf eine spezifische Eigenschaft von adulter Neurogenese in Primaten verweisen könnte. In einer ausführlicheren Studie wurde in 20 Arten oder Unterarten die verschiedenen Zellpopulationen im ganzen Hippocampus bestimmt, zusätzlich zu den Neurogenesedaten in 12 Arten oder Unterarten. Mit Hilfe einer Korrespondenzanalyse konnten wir die Beziehungen der verschiedenen Zellpopulationen zueinander unabhängig von Größenunterschieden zwischen den Arten vergleichen. In dieser Analyse bildeten die Nagetiere eine eigene, distinkte Gruppe. Wenn die Anzahl von proliferierenden Zellen und neugeborenen Neuronen in der Analyse mitberücksichtigt werden, separiert jede Zellgruppe die Nagetiere voneinander. Das deutet darauf hin, dass die Neurogenese mehr Variation innerhalb einer phylogenetischen Gruppe zulässt und somit mehr Plastizität erlaubt als die anderen Zellpopulationen im Hippocampus. Weiter zeigt sich, dass die Balance zwischen Zellteilung und neuronaler Differenzierung in verschiedenen Arten deutlich unterschiedlich sein kann. Möglich wären somit verschiedene Strategien für die Neuroplastizität, etwas, das auch in den artspezifischen Reifungsphasen im Weissbüschelaffen zu sehen war. Zusammenfassend zeigt diese Studie dass adulte Neurogenese ein ontogenetischer Mechanismus für schnelle Anpassungen an Umweltveränderungen sein kann, während ein phylogenetisches, relativ stabiles Muster die Proportionen der hippocampalen Zellpopulationen vorgibt.

Das dritte und letzte Thema ist die Verhaltensfunktion der adulten Neurogenese. In einem umfangreichen Phenotypisierungs-Experiment haben wir eine grosse Anzahl an Verhaltensparametern in zwei Mausstämmen analysiert und den Einfluss der adulte Neurogenese auf das Verhalten untersucht: Getestet wurden DBA und C57BL/6 Mäuse, jeweils in zwei Altersgruppen von 3 und 5 Monaten. Das ursprüngliche Ziel der Studie richtete sich auf den Zusammenhang zwischen Neurogenese und Angst sowie impulsivem Verhalten. Wir fanden keinen Zusammenhang zwischen diesen Verhalten und Neurogenese, dafür aber eine starke Korrelation zwischen Neurogenese und der Art, wie die Tiere ein neues experimentelles Umfeld erkunden. Dieser Effekt wurde nur in Tieren der älteren Altersgruppe beobachtet. Es ist bekannt, dass der Hippocampus an der Art und Weise beteiligt ist, wie Tiere sich verhalten wenn sie sich in einer neuen Umgebung befinden, ein Zusammenhang mit

adulter Neurogenese wurde jedoch für diese Verhalten noch nicht beschrieben. Diese Resultate könnten die Unstimmigkeiten erklären, welche in vielen Studien auftreten die sich mit adulter Neurogenese und Verhalten beschäftigen. In klassischen Verhaltensexperimenten werden Tiere aus ihrem Heimkäfig herausgenommen und in einem für das Tier neuen Umfeld, z.B. kognitiv, getestet. Die Korrelation zwischen Neurogenese und Verhalten in dieser neuen Umgebung könnte leicht als eine Korrelation zwischen Neurogenese und dem Ergebnis des kognitiven Tests interpretiert werden. Studien haben bereits gezeigt dass ein Effekt der Neurogenese nur beobachtet wurde, wenn das Experimentumfeld für das Tier neu war. Diese Befunde aus Labortierexperimenten sind in einem grösseren Kontext, namentlich bei wilden Tieren, sehr entscheidend. Unterschiede in der Art und Weise wie ein neues Umfeld erkundet wird reflektieren die Unterschiede in Neurogenes, und können schlussendlich ein Überlebensvorteil sein.