

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

„Der Effekt Spermidins und der Hypusinierung des eukaryotischen  
Initiationsfaktors 5A auf die Plastizität kortikaler Primärkulturen der Ratte“

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

|               |              |
|---------------|--------------|
| vorgelegt von | Anna Raffauf |
| aus           | Berlin       |
| Magdeburg     | 2023         |

# Dokumentationsblatt

## **Bibliographische Beschreibung:**

Raffauf, Anna

Der Effekt Spermidins und der Hypusinierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 5A auf die Plastizität kortikaler Primärkulturen der Ratte

Magdeburg 2023 – 90 Bl: 21 Abb., 5 Tab., 1 Anl.

## **Kurzreferat:**

Unsere durchschnittliche Lebenserwartung steigt und führt damit auch zu einer Zunahme altersbedingter Beeinträchtigungen kognitiver Funktionen. Studien deuten darauf hin, dass die Proteinhomöostase und die Autophagie entscheidende Faktoren im Alterungsprozess sind. Spermidin, ein Autophagie-Induktor, verlängert nachweislich die Lebensspanne, verbessert neuronale und kognitive Funktionen und hat sich in verschiedenen Modellorganismen als neuroprotektiv erwiesen. Diese Wirkungen könnten unter anderem auf die Hypusinierung des Translationsinitiationsfaktors 5A-1 (eIF5A) zurückzuführen sein. Ziel der Arbeit war es, die Auswirkungen von Spermidin und der eIF5A-Hypusinierung, einer einzigartigen posttranslationalen Modifikation, auf die neuronale Plastizität zu untersuchen. Hierfür wurden zwei experimentelle Serien durchgeführt. In der ersten Serie wurden primäre neurale Zellkulturen der Ratte an DIV 21, DIV 42 und DIV 84 in jeweils 24-stündigen oder 48-stündigen Intervallen mit einer Konzentration von 50  $\mu$ M Spermidin behandelt. Um die Rolle der eIF5A-Hypusinierung weiter zu charakterisieren, wurde in einer zweiten Serie die zelluläre Konzentration der an der Modifikation beteiligten Desoxyhypusinsynthase (DHPS) verändert. Die Ergebnisse der Studie legten nahe, dass die Spermidin-Behandlung eine Beschleunigung des dendritischen Wachstums und eine morphologische Verjüngung der Neuronen hervorrief. Darüber hinaus deuteten die Ergebnisse auf eine zentrale Bedeutung der endogenen Hypusinierung des eIF5A und ein enges Konzentrationsfenster der DHPS hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Neuronenmorphologie hin. Die Überexpression der DHPS führte auf synaptischer Ebene zu Ergebnissen, die analog zu den Messungen der Spermidin-Applikation waren. Zur Etablierung von Spermidin als *Anti-Aging*-Therapeutikum sind weitere Experimente *in vitro* und *in vivo* notwendig.

## **Schlüsselwörter:**

Spermidin, eIF5A Hypusinierung, DHPS, Sholl-Analyse, synaptisches Altern, neuronale Plastizität, Neuritogenese

# Inhaltsverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <b>Dokumentationsblatt</b> .....   | <b>I</b>   |
| <b>Tabellenverzeichnis</b> .....   | <b>V</b>   |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b> .....   | <b>VI</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....   | <b>VII</b> |
| <b>1 Einleitung</b> .....  | <b>1</b>   |
| 1.1 <i>Alternde Gesellschaften und ihre Auswirkungen</i> .....                     | 1          |
| 1.2 <i>Polyamine und ihre Funktionen</i> .....                                     | 1          |
| 1.3 <i>Spermidin - ein Jungbrunnen?</i> .....                                      | 3          |
| 1.3.1 <i>Sinkende Polyaminspiegel im Alter</i> .....                               | 4          |
| 1.3.2 <i>Verbesserte Gedächtnisleistung durch Spermidin-Supplementierung</i> ..... | 5          |
| 1.4 <i>Eine unausgeglichene Proteinhomöostase und der eIF5A</i> .....              | 5          |
| 1.5 <i>Neuronale Plastizität</i> .....   | 6          |
| 1.5.1 <i>Synaptische Plastizität</i> .....   | 8          |
| 1.5.2 <i>Dendritische Verzweigung</i> .....  | 9          |
| 1.6 <i>Fragestellung</i> .....   | 9          |
| <b>2 Material und Methoden</b> .....   | <b>11</b>  |
| 2.1 <i>Material</i> .....  | 11         |
| 2.1.1 <i>Chemikalien</i> .....   | 11         |
| 2.1.2 <i>Tiere</i> .....   | 11         |
| 2.1.3 <i>Bakterienstämme und Nährmedien</i> .....                                  | 11         |
| 2.1.4 <i>Antikörper</i> .....  | 12         |
| 2.2 <i>Methoden</i> .....  | 13         |
| 2.2.1 <i>Zellbiologische Methoden</i> .....  | 13         |
| 2.2.2 <i>Molekularbiologische Methoden</i> .....                                   | 15         |
| 2.2.3 <i>Biochemische Methoden</i> .....   | 18         |
| 2.2.4 <i>Bildgebung</i> .....  | 21         |
| 2.2.5 <i>Bildanalysen</i> .....  | 21         |
| 2.2.6 <i>Statistik</i> .....   | 22         |
| <b>3 Ergebnisse</b> .....  | <b>23</b>  |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.1      | <i>Morphologische Charakterisierung altersabhängiger Veränderungen von Neuronen kortikaler Primärkulturen der Ratte und deren Beeinflussung durch Spermidin-Supplementierung</i>    | 23        |
| 3.1.1    | Sholl-Analyse alternder Neurone <i>in vitro</i>   | 23        |
| 3.1.2    | Sholl-Analyse der Neurone unterschiedlicher Altersgruppen <i>in vitro</i> nach Spermidin-Applikation  | 24        |
| 3.1.3    | Analyse der Dendritenlänge Spermidin-behandelter Neurone unterschiedlicher Altersgruppen <i>in vitro</i>  | 28        |
| 3.1.4    | Analyse prä- und postsynaptischer Proteinmarker alternder Neurone <i>in vitro</i>   | 29        |
| 3.1.5    | Analyse prä- und postsynaptischer Signale Spermidin-behandelter Neurone unterschiedlicher Altersstufen <i>in vitro</i>  | 32        |
| 3.2      | <i>Morphologische Analyse kortikaler Primärneurone in vitro nach lentiviraler Überexpression oder knock-down der DHPS</i>   | 38        |
| 3.2.1    | Effektivitätsprüfung der Überexpressions- und <i>knock-down</i> -Konstrukte   | 38        |
| 3.2.2    | Sholl-Analyse kortikaler Primärneurone nach <i>knock-down</i> und Überexpression der DHPS   | 39        |
| 3.2.3    | Auswertung der Dendritenlänge nach DHPS-Überexpression und DHPS- <i>knock-down</i>  | 41        |
| 3.2.4    | Analyse der prä- und postsynaptischen Signale nach DHPS-Überexpression und DHPS- <i>knock-down</i>  | 42        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>45</b> |
| 4.1      | <i>Kortikale Primärkulturen als Modellorganismus des Alterns</i>  | 45        |
| 4.2      | <i>Quantitative Analyse der Auswirkungen des Alterungsprozesses auf die dendritische Komplexität und synaptische Architektur</i>  | 46        |
| 4.2.1    | Untersuchung der neuronalen Morphologie durch Sholl-Analysen und Messung der Dendritenlänge   | 46        |
| 4.2.2    | Quantifizierung der Synapsen und prä- und postsynaptischen Signale  | 47        |
| 4.3      | <i>Charakterisierung der Spermidinwirkung auf kortikale Primärkulturen verschiedener Altersstufen: Eine Untersuchung der dendritischen Komplexität und synaptischen Architektur</i> | 49        |
| 4.3.1    | Analyse der dendritischen Morphologie von Neuronen unterschiedlicher Altersstufen nach Spermidin-Applikation  | 50        |
| 4.3.2    | Spermidin-induzierte Veränderungen der synaptischen Morphologie   | 52        |
| 4.4      | <i>Genetische Modulation der neuronalen DHPS-Konzentration</i>  | 54        |
| 4.4.1    | Veränderungen der dendritischen Morphologie unter modifizierter DHPS- Konzentration   | 55        |
| 4.4.2    | Veränderungen der synaptischen Signale unter modifizierter DHPS-Konzentration   | 56        |
| 4.5      | <i>Ausblick</i>   | 57        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>59</b> |
| <b>6</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>   | <b>61</b> |



|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>7</b>  | <b>Danksagung.....</b>   | <b>78</b> |
| <b>8</b>  | <b>Ehrenerklärung.....</b>   | <b>79</b> |
| <b>9</b>  | <b>Darstellung des Bildungsweges.....</b>                                    | <b>80</b> |
| <b>10</b> | <b>Anlagen .....</b>   | <b>81</b> |
| 10.1      | <i>Prüfung der Effektivität des DHPS-knock-downs in HEK293T-Zellen .....</i> | <i>81</i> |

# Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| TABELLE 2.1: BAKTERIEN MEDIEN .....   | 11 |
| TABELLE 2.2: PRIMÄRE ANTIKÖRPER.....  | 12 |
| TABELLE 2.3: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER .....   | 12 |
| TABELLE 2.4: PIPPETIERSHEMA DES BSA-STANDARDS .....                                 | 19 |
| TABELLE 2.5: ZUSAMMENSETZUNG 5-20 % POLYACRYLAMID-TRIS-GLYCIN GRADIENTEN-GELE ..... | 20 |

# Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| ABBILDUNG 1.1: DIE POLYAMIN SYNTHESE UND HYPUSINIERUNG DES EIF5A .....   | 3  |
| ABBILDUNG 1.2: STRUKTURELLER AUFBAU EINER EXZITATORISCHEN SYNAPSE .....  | 7  |
| ABBILDUNG 2.1: DARSTELLUNG DER SHOLL-MASKE .....   | 22 |
| ABBILDUNG 3.1: ALTERNDE NEURONE <i>IN VITRO</i> VERLIEREN IHRE MORPHOLOGISCHE KOMPLEXITÄT .....  | 24 |
| ABBILDUNG 3.2: SPERMIDIN-SUPPLEMENTIERUNG FÜHRT ZU KEINEN SIGNIFIKANTEN VERÄNDERUNGEN IN DER MORPHOLOGIE VON JUNGEN (DIV21) PRIMÄRNEURONEN <i>IN VITRO</i> ..... | 25 |
| ABBILDUNG 3.3: MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN NEURONALER ZELLEN NACH SPERMIDIN-SUPPLEMENTIERUNG VON MITTELALTEN (DIV42) PRIMÄRKULTUREN .....                       | 26 |
| ABBILDUNG 3.4: SPERMIDIN-SUPPLEMENTIERUNG FÜR 24 H FÜHRT ZU MEHR DENDRITISCHEN VERZWEIGUNGEN BEI ÄLTEREN NEURONEN (DIV84) .....                                  | 27 |
| ABBILDUNG 3.5: REJUVINATIONEFFEKT BEI GEALTERTEN PRIMÄRNEURONEN <i>IN VITRO</i> , 24 H NACH SPERMIDIN-SUPPLEMENTIERUNG .....                                     | 28 |
| ABBILDUNG 3.6: DIE DENDRITENLÄNGE VON PRIMÄRNEURONEN <i>IN VITRO</i> NIMMT ALTERSABHÄNGIG ZU UND WIRD DURCH APPLIKATION VON SPERMIDIN NICHT BEEINFLUSST .....    | 29 |
| ABBILDUNG 3.7: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINES DIV 84 ALTEN, FÜR 24 H MIT SPERMIDIN BEHANDELTEN NEURONS .....  | 30 |
| ABBILDUNG 3.8: ALTERSABHÄNGIGE VERÄNDERUNG DER SYNAPTISCHEN MORPHOLOGIE IN KORTIKALEN PRIMÄRNEURONEN .....   | 31 |
| ABBILDUNG 3.9: DIE INTENSITÄT DES SYPHY 1 SIGNALS IST BEI JUNGEN PRIMÄRNEURONEN (DIV 21) DURCH SPERMIDIN-SUPPLEMENTIERUNG VERMINDERT .....                       | 33 |
| ABBILDUNG 3.10: SPERMIDIN-SUPPLEMENTIERUNG FÜHRT BEI 42 TAGE ALTEN NEURONEN KORTIKALER PRIMÄRKULTUREN ZU VERÄNDERUNGEN DES SYPHY 1 SIGNALS .....                 | 34 |
| ABBILDUNG 3.11: SPERMIDIN-SUPPLEMENTIERUNG GEALTERTER NEURONALER PRIMÄRKULTUREN (DIV84) FÜHRT ZU VERÄNDERUNGEN DER SYPHY 1 UND HOMER 1 SIGNALE .....             | 35 |
| ABBILDUNG 3.12: VERÄNDERTE SYNAPSENSTRUKTUR BEI ALTEN (DIV 84), SPERMIDIN-BEHANDELTEN NEURONEN IM VERGLEICH ZU JUNGEN (DIV 21) UNBEHANDELTEN NEURONEN .....      | 37 |
| ABBILDUNG 3.13: DHPS-KONZENTRATION NACH LENTIVIRALER TRANSDUKTION DER VERWENDETEN KONSTRUKTE .....   | 38 |
| ABBILDUNG 3.14: MIT FUGW-LEERVEKTOR UND FUGW-DHPS INFIZIERTE NEURONE ZEIGEN EINE STÄRKERE VERZWEIGUNG DER DENDRITEN .....  | 40 |
| ABBILDUNG 3.15: <i>KNOCK-DOWN</i> DER DHPS FÜHRT ZU EINER VERRINGERTEN ARBORISIERUNG NEURONALER DENDRITEN.....   | 41 |
| ABBILDUNG 3.16: EIN <i>KNOCK-DOWN</i> DER DHPS FÜHRT ZU EINER REDUKTION DER MAXIMALEN DENDRITENLÄNGE .....   | 42 |
| ABBILDUNG 3.17: MULTIPLE VERÄNDERUNGEN DES SYPHY 1 SIGNALS NACH INFESTION MIT DEM ÜBEREXPRESSIONSKONSTRUKT FUGW-DHPS .....                                       | 43 |
| ABBILDUNG 3.18: INTENSITÄTSMINDERUNG DES SYPHY 1 UND HOMER 1 SIGNALS NACH <i>KNOCK-DOWN</i> DER DHPS .....   | 44 |
| ABBILDUNG 10.1: EFFEKTIVITÄT DES DHPS- <i>KNOCK-DOWNS</i> .....  | 81 |

# Abkürzungsverzeichnis

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| $\mu\text{l}$                    | Mikroliter  |
| $\mu\text{M}$                    | Mikromolar  |
| $^{\circ}\text{C}$               | Grad Celsius  |
| ANOVA                            | Analysis-of-Variances                                 |
| APS                              | Ammoniumperoxodisulfat                                |
| BSA                              | Bovines Serumalbumin                                  |
| ddH <sub>2</sub> O               | zweifach destilliertes H <sub>2</sub> O               |
| DIV                              | days <i>in vitro</i>                                  |
| DHPS                             | Desoxyhypusinesynthase                                |
| DMEM                             | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                    |
| eIF5A                            | eukaryotischer Initiationsfaktor 5A                   |
| FBS                              | fötales Kälberserum                                   |
| G                                | Gauge   |
| GC-7                             | N(1)-guanyl-1,7-diaminoheptane                        |
| h                                | Stunde  |
| HBSS                             | Hank's Balanced Salt Solution                         |
| HEPES                            | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HRP                              | horseradish peroxidase                                |
| KCl                              | Kaliumchlorid   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | Kaliumdihydrogenphosphat                              |
| LB                               | lysogeny broth  |
| M                                | Molar   |
| MAP 2                            | Mikrotubuli assoziiertes Protein 2                    |
| MgCl <sub>2</sub>                | Magnesiumchlorid                                      |
| MgSO <sub>4</sub>                | Magnesiumsulfat                                       |
| min                              | Minuten   |
| ml                               | Milliliter  |
| mM                               | Millimolar  |
| MOI                              | Multiplicity of Infection                             |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Dinatriumhydrogenphosphat                             |
| NaCl                             | Natriumchlorid  |
| NAOH                             | Natriumhydroxid                                       |
| nm                               | Nanometer   |

|         |                                    |
|---------|------------------------------------|
| ODC     | Ornithindecaboxylase               |
| PBS     | Phosphate-buffered saline          |
| pH      | <i>potentia hydrogenii</i>         |
| PLP     | Periodate-lysine-paraformaldehyde  |
| PSD     | Postsynaptische Dichte             |
| PSD-95  | Postsynaptic density protein 95    |
| RT      | Raumtemperatur                     |
| s       | Sekunde                            |
| SDS     | sodium dodecylsulfate              |
| SPM     | Spermidin                          |
| shRNA   | short hairpin RNA                  |
| Syphy   | Synaptophysin                      |
| Syphy 1 | Synaptophysin 1                    |
| TBS     | Tris buffered saline               |
| TEMED   | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| ZNS     | Zentrales Nervensystem             |

# 1 Einleitung

## 1.1 Alternde Gesellschaften und ihre Auswirkungen

Aufgrund wachsenden technischen Fortschritts, gesteigerter Lebensqualität und besserer medizinischer Versorgung steigt die durchschnittliche Lebenserwartung weltweit [1]. Im Jahr 2050 könnte jeder vierte Einwohner Europas und Nordamerikas 65 Jahre alt oder älter sein [2]. Dieser demographische Wandel bringt weitreichende, ökonomische, gesellschaftliche aber auch gesundheitliche Veränderungen mit sich [3–5]. Die Inzidenz von altersbedingten Krankheiten wie maligne neoplastische, kardiovaskuläre- und neurodegenerative Erkrankungen nimmt zu [6]. Insbesondere das zentrale Nervensystem (ZNS) unterliegt dem fortschreitenden Alterungsprozess. Dies äußert sich bei normaler kognitiver Alterung in der Abnahme des Gedächtnisses und der fluiden Intelligenzleistung [7–9]. Aber auch eine Vielzahl pathologischer Prozesse wirken sich auf die Gedächtnisleistung aus. So sind in Deutschland aktuell 1,7 Millionen Menschen von einer Demenzerkrankung betroffen und jährlich werden 300.000 Neuerkrankungen diagnostiziert [10]. Dadurch entstehen hohe gesamtgesellschaftliche Kosten. Im Jahr 2016 lagen diese bei 73 Milliarden Euro, mit einem geschätzten Anstieg auf 195 Milliarden Euro bis 2060 [11]. Das Wohlbefinden von Demenzerkrankten einzuschätzen ist schwierig, aber Banerjee et al. konnten zeigen, dass die Lebensqualität insbesondere bei jüngeren Patienten vermindert war [12, 13]. Aus diesen Gründen wird es immer wichtiger die Veränderungen des Alterns auf zellulärer Ebene zu verstehen und mögliche Einflussfaktoren frühzeitig zu erkennen. Auf der Suche nach dem „heiligen Gral“ zum „healthy aging“ sind Polyamine und insbesondere Spermidin seit einigen Jahren ein wichtiger Meilenstein und aktueller Gegenstand der Forschung [14–16].

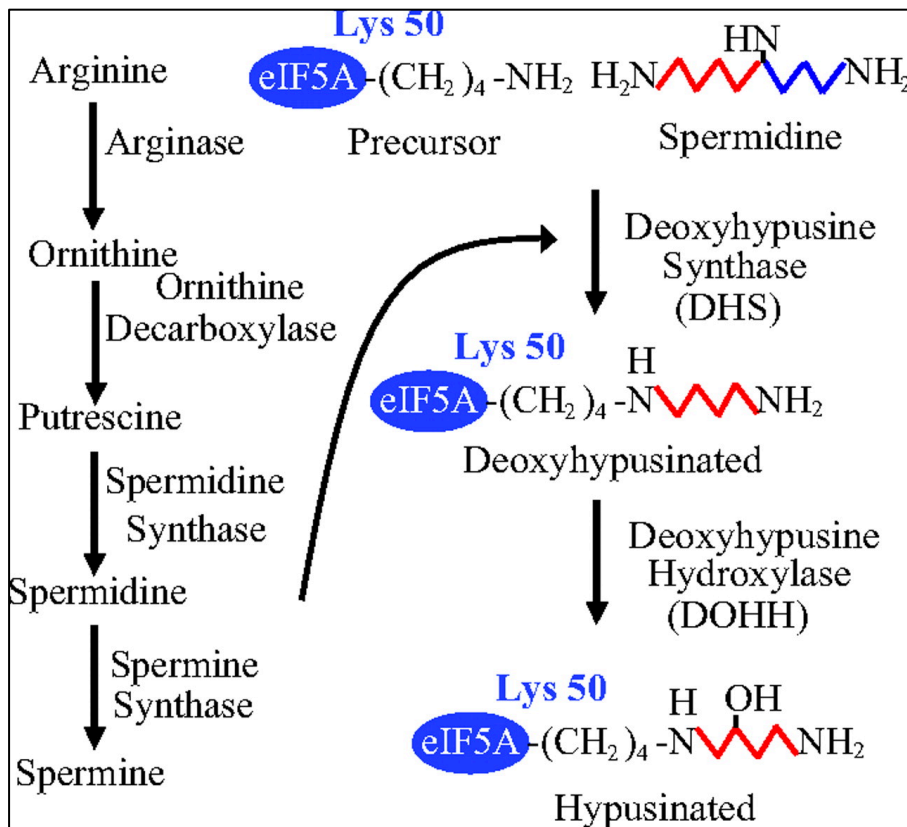
## 1.2 Polyamine und ihre Funktionen

Altern ist ein multidimensionaler Prozess, der durch eine Akkumulation von Schäden von diversen Funktionseinbußen gekennzeichnet ist [17, 18]. López-Otín et al. beschrieben Zellalterung als eines von neun Kennzeichen des Alterungsprozesses [17]. Polyamine spielen dabei, auf Grund ihrer Beteiligung an grundlegenden Prozessen wie Zellwachstum und -vermehrung, eine essentielle Rolle [19]. Es gibt drei natürlich vorkommende Polyamine: Putrescin sowie dessen Derivate Spermin und Spermidin. Sie sind gekennzeichnet durch eine endständige Aminogruppe sowie weitere sekundäre Aminogruppen. Die Umwandlung der Aminosäure Arginin in Ornithin stellt den Ausgangspunkt der Polyamin-Biosynthese dar. Putrescin wird durch eine Ornithin-Decarboxylase (ODC) aus Ornithin biosynthetisiert. Die anschließende Spermidin-Synthase katalysiert den Transfer zu Spermidin, welches in Spermin umgewandelt werden kann [15]. Die Bildung von Spermin ist reversibel, so dass ein Gleichgewicht zwischen Spermidin und Spermin aufrechterhalten wird [20, 21] (siehe Abbildung

1.1). Die Polyaminsynthese wird über eine negative Rückkopplungsschleife durch die mRNA der ODC reguliert [22].

Neben der endogenen Synthese können Polyamine dem Organismus auch von außen zugeführt werden. Polyamine werden im Magen-Darm-Trakt sowohl durch endozytäre als auch durch Solute-Carrier-Transportmechanismen aufgenommen. Die meisten eukaryotischen Zellen exprimieren auf ihrer Zellmembran eine Polyamin-transportierende ATPase, welche die Aufnahme von exogenen Polyaminen erleichtert [23, 24]. Eine langfristige Erhöhung der Polyaminzufuhr über die Nahrung bei Menschen und Mäusen führte zu einem allmählichen Anstieg des Polyamingehalts im Blut [25]. Das heißt der systemische Polyamin- und Spermidinspiegel kann durch die Ernährung beeinflusst werden [26].

Bei physiologischem pH sind Polyamine positiv geladen und binden an negativ geladene Gruppen verschiedener Zellkomponenten wie Nukleinsäuren, Proteine und Membranen [27, 28]. Dort haben sie eine Vielzahl von Funktionen, wie die schützende Wirkung auf die Struktur von Membranen und Nukleinsäuren [20, 29]. Sie wirken antioxidativ, spielen eine Rolle bei der Protein- und Nukleinsäuresynthese, und regulieren durch Transkriptions- und Translationseffekte die Expression vieler Gene [30–34]. Daneben modulieren sie die Aktivität von Ionenkanälen und verschiedenen Kinasen [35–37]. Zusätzlich ist das Polyamin-System ein wichtiger Faktor bei diversen pathologischen Prozessen [38]. Eine Häufung von Polyaminen und Hochregulierung des Enzyms ODC wurde in Tumoren mit einer hohen Zellteilungsrate beobachtet [39–42]. Auch im Zusammenhang mit neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen wie Schlaganfall, Epilepsie, Depression und Schizophrenie konnten signifikante Veränderungen im Polyamin-Metabolismus nachgewiesen werden [43–47].



**Abbildung 1.1: Die Polyamin Synthese und Hypusinierung des eIF5A**

Im linken Teil der Abbildung ist die zelluläre Polyamin-Biosynthese ausgehend von der Aminosäure Arginin dargestellt. Außerdem dient sie als Spermidin-Donator für die posttranslationale Hypusin-Modifikation des eIF5A. Hierbei wird die seltene Aminosäure Hypusin an einem Lysinrest des eIF5a gebildet. Der Prozess der Hypusinierung ist in zwei Teile gegliedert: Zunächst bindet die Desoxyhypusinsynthase (DHPS) Spermidin kovalent an einen bestimmten Lysinrest (Lys<sub>50</sub>) des eIF5A, um das Zwischenprodukt eIF5A-Desoxyhypusin zu bilden. In einem zweiten Schritt modifiziert die Desoxyhypusinhydroxylase das Zwischenprodukt zum funktionell aktiven hypusinierten eIF5A. Grafik adaptiert nach Huang et al. [48]

### 1.3 Spermidin - ein Jungbrunnen?

Spermidin, eines der biogenen Polyamine, ist in allen lebenden Organismen und menschlichen Körperzellen vorhanden, weist aber besonderes hohe Konzentrationen in zerebralen Strukturen auf [49]. Exogen zugeführtes Spermidin verlängert die Lebensspanne, wirkt kardioprotektiv und verbessert die kognitiven Funktionen [50–54], wobei allerdings hohe Mengen an Spermidin durch reaktive Aldehyde und Sauerstoffradikale oxidativen Stress erzeugen und potentiell toxisch wirken können [27, 55]. Die Daten von Schwarz et al. zeigen, dass die Aufnahme von spermidinreichen Lebensmitteln sowohl bei Ratten, als auch älteren Menschen sicher und gut verträglich ist [56].

In Experimenten an verschiedenen Organismen wurde die neuroprotektive Wirkung von Spermidin dargestellt. Gupta et al. konnten zeigen, dass eine Spermidin-Supplementierung die altersbedingte



Gedächtnisbeeinträchtigung bei *Drosophila melanogaster* reduzierte [57]. Zusätzlich verringerte es den  $\alpha$ -Synuclein-induzierten Verlust dopaminerger Neuronen, ein pathophysiologisches Merkmal des Morbus Parkinson, bei *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* [58]. Schwarz et al. wiesen zudem einen Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Spermidin mit der Nahrung und dem Volumen des Hippocampus sowie der Dicke der Kortikalis bei älteren Menschen nach [59].

Es wird angenommen, dass die positiven Effekte Spermidins unter anderem auf einer Aktivierung der Autophagie basieren [57, 60, 61] einem zellulären Wiederaufbereitungsmechanismus, der zelleigene Makromoleküle und Organellen in seine Grundbausteine zerlegt und dem Zellmetabolismus zur Wahrung der Zellhomöostase wieder zur Verfügung stellt [62]. Nervenzellen gehören aufgrund ihres postmitotischen Zustands, bei gleichzeitiger hoher metabolischer Aktivität, zu jenen Zelltypen, die besonders auf die Autophagie angewiesen zu sein scheinen [63, 64]. Folglich führen Beeinträchtigung der Autophagie zu einer Neurodegeneration [65, 66]. Zudem wurde gezeigt, dass die gesteigerte Expression von Autophagie-assoziierten Genen im Nervensystem mit einer um 50 % verlängerten Lebensspanne in *Drosophila* einhergeht [67]. Die Induktion der Autophagie durch Spermidin geschieht über die Hemmung mehrerer Acetyltransferasen, die als wichtige negative Regulatoren der Autophagie gelten [50, 68, 69]. Bestätigt wird dies durch die Feststellung, dass die positiven Auswirkungen von Spermidin auf die Lebensspanne und die Neuroprotektion nach der Inaktivierung wesentlicher, mit Autophagie- assoziierter Gene aufgehoben wurden [50, 57].

An NMDA-Rezeptoren führt Spermidin durch Verbesserung der Zugänglichkeit der Glutamat-Bindungsstelle zu einer allosterischen Aktivierung und erhöht die Öffnungshäufigkeit des Rezeptors [70, 71]. Als einer der wichtigsten Typen ionotroper Glutamatrezeptoren im ZNS spielen NMDA-Rezeptoren eine grundlegende Rolle in der Induktion synaptischer Plastizität [72, 73]. Daneben hat Spermidin aber auch eine antiinflammatorische Wirkung, beeinflusst den Lipidstoffwechsel und spielt bei der Regulierung von Zellwachstum, -vermehrung und -tod eine Rolle [19, 74]

### 1.3.1 Sinkende Polyaminspiegel im Alter

Verschiedene Studien, in denen der Gehalt an Polyaminen in Organen von Nagern und Menschen gemessen wurde, kommen zu unterschiedlichen räumlichen und zeitlichen Verteilungsmustern. Nishimura et al. bestimmten an Ratten die höchsten Polyaminspiegel in Pankreas und Thymus gefolgt von Milz und Ovar. In fast all diesen Organen zeigte sich im Vergleich zwischen 3, 10 und 26 Wochen alten Ratten eine Abnahme der Polyaminspiegel im Laufe der Alterung. Eine der wenigen Ausnahmen stellte das Gesamthirngewebe dar, welches keine Änderung des Polyamingehaltes zeigte [75]. Liu et al. untersuchten verschiedene gedächtnisassoziierte Strukturen in 4, 12 und 24 Monate alten Ratten

und fanden divergierende Polyaminspiegel. So waren im Hippocampus die Putrescinwerte im CA1 und Gyrus dentatus signifikant verringert und im CA2/3 mit dem Alter erhöht. Ein signifikanter altersbedingter Anstieg der Spermidinwerte wurde im CA1 und CA2/3 festgestellt. Somit wurden altersbedingte regionsspezifische Veränderungen der Polyamine in gedächtnisassoziierten Strukturen nachgewiesen [76]. Es kann davon ausgegangen werden, dass die intrazelluläre Spermidinkonzentration im Laufe des natürlichen Alterungsprozesses Schwankungen unterliegt und in vielen Organen abnimmt [21, 38, 75]. Dies geht einher mit einem Konzentrations- und Aktivitätsabfall der ODC, die für die Synthese von Polyaminen unerlässlich ist [77]. Es ist nach wie vor unklar, ob der Mangel an Polyaminen eine Ursache oder eine Folge des Alterungsprozesses ist. Aber es ist davon auszugehen, dass Funktionsstörungen des Polyaminstoffwechsels zur altersbedingten Beeinträchtigung des Lernprozesses und Gedächtnisses beitragen [50]. Madeo et al. postulieren, dass Spermidin mit zunehmendem Alter den Status eines Vitamins annimmt und eine Supplementierung für die Homöostase des Organismus erforderlich ist [78].

### 1.3.2 Verbesserte Gedächtnisleistung durch Spermidin-Supplementierung

Erste klinische Studien mit Polyaminen zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Bei einer Pilotstudie verbesserte eine dreimonatige tägliche Supplementierung mit Spermidin bei älteren Menschen mit subjektivem kognitivem Abbau die mnemonische Diskriminationsleistung [79]. Eine sich daran anschließende Studie von Schwarz et al. mit einer 12-monatigen Polyamingabe und einer größeren Anzahl an Teilnehmer\*innen bei gleichen Einschlusskriterien zeigte keine besseren Gedächtnisleistungen im Vergleich zur Placebogruppe [80]. Da in der genannten Studie jedoch gesunde ältere Proband\*innen teilnahmen, bei denen über ein Jahr ein leichter kognitiver Rückgang erwartbar gewesen wäre, könnte Spermidin vorbeugend auf altersbedingte Gedächtnisstörungen gewirkt haben [80]. Eine weitere Studie mit dreimonatiger Spermidin-Supplementierung in unterschiedlichen Dosierungen wies eine positive Wirkung von Spermidin bei älteren demenzkranken Erwachsenen auf. Es wurde eine Verbesserung der kognitiven Leistung bei Proband\*innen mit leichter und mittelschwerer Demenz in der Gruppe gemessen, welche die höhere Spermidin-Dosis erhielt [81].

## 1.4 Eine unausgeglichene Proteinhomöostase und der eIF5A

Ein weiteres Merkmal der Zellalterung ist eine gestörte Proteinhomöostase, auch Proteostase genannt. Darunter versteht man die dynamische Regulierung eines ausgewogenen, funktionellen Proteoms. Zu den zellulären Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Proteostase gehören die balancierte Proteintranslation, -faltung und -degradation [82]. Insbesondere Neurone reagieren sensibel auf Beeinträchtigungen des Systems. Eine gestörte Proteinhomöostase kann somit eine erhebliche Beeinträchtigung des Gedächtnisses, wie bei der Alzheimer-Demenz, nach sich ziehen [83].

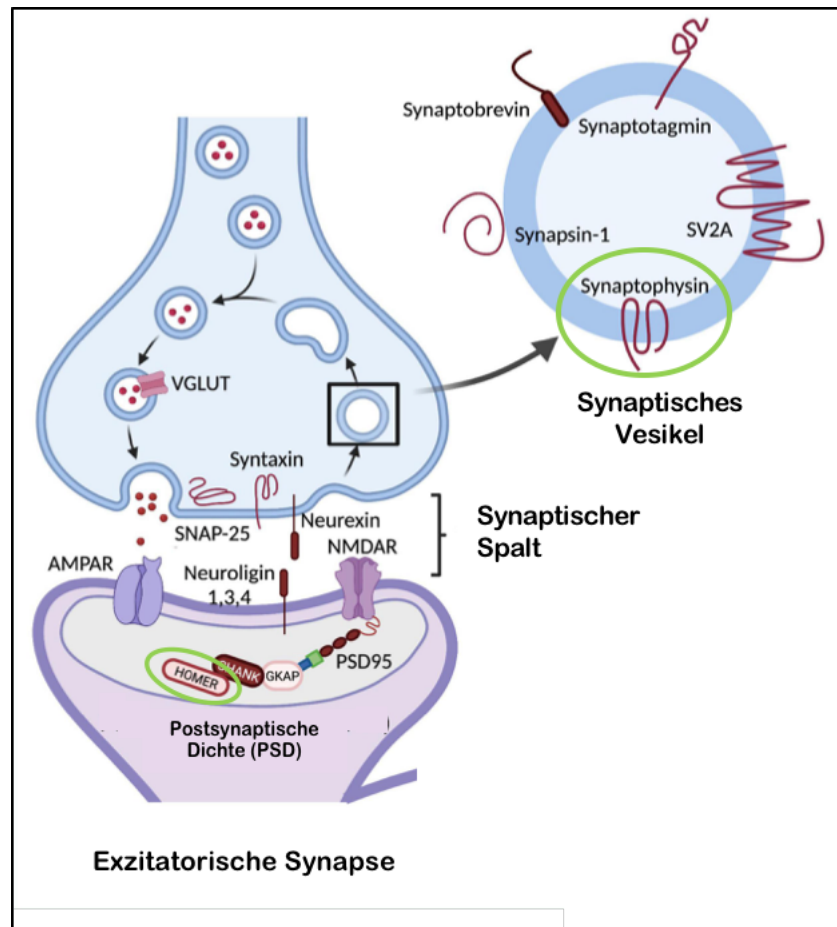
Auch die Neusynthese von Proteinen ist bei älteren Organismen beeinträchtigt. Dwyer et al. untersuchten die Proteinneusynthese *in vivo* in verschiedenen Hirnregionen (Cortex, Cerebellum und Hirnstamm) von weiblichen Long-Evans Ratten verschiedenen Alters. In den Ratten nahm die Neusynthese von Proteinen im Laufe des Alterungsprozesses signifikant ab [84]. Gleichzeitig verringerten sich auch die Konzentrationen proteinogener Aminosäuren und die Spiegel ihrer Metabolite im Gehirn mit zunehmendem Lebensalter [85].

Spermidin ist auch Substrat der Hypusiniierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 5A (eIF5A). Bei dieser posttranslationalen Modifikation des Faktors katalysiert die Desoxyhypusinsynthase (DHPS), mit Spermidin als Donator, die Übertragung eines 4-Aminylbutylrestes auf das Lys<sub>50</sub> des eIF5A. Eine Hydroxylierung durch Desoxyhypusinhydroxylase (DOHH) führt zur Bildung von Hypusin, einer seltenen Aminosäure die in Eukaryonten ausschließlich gebunden an den eIF5A vorkommt. (siehe Abbildung 1.1) [86]. Zuvor fälschlicherweise als Initiationsfaktor klassifiziert, spielt der eIF5A eine entscheidende Rolle im Translationsprozess bei der Elongation von Proteinen mit Prolin-reichen Abschnitten [87, 88]. Prolin bewirkt eine Veränderung der Sekundärstruktur der Polypeptidketten, was zu einer Arretierung der Translation führen kann [89]. Es wird vermutet, dass der aktivierte eIF5A eine direkte Wirkung auf blockierte Ribosomen hat und für die Wiederaufnahme der Proteinelongation benötigt wird [90]. Jenes deckt sich mit der Feststellung einer altersabhängigen Verarmung von eIF5A und der anschließenden Anhäufung von inaktiven Ribosomen [34, 90, 91]. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass das Fehlen von eIF5A nicht nur bei Prolin-reichen Proteinen, sondern auch bei der Translation von verschiedenen Tripeptid-Sequenzen zu blockierten Ribosomen führt, was auf einen globalen Einfluss auf die Translation schließen lässt [92]. Ein *knock-out* des eIF5A-1-Gens oder des DHPS-Gens führte bei Mäusen zu einer frühen embryonalen Letalität, was die essentielle Bedeutung bestätigt [93]. Liang et al. und Hofer et al. demonstrierten, dass im *Drosophila melanogaster*-Gehirn der hypusinierte eIF5A-Spiegel mit dem Alter abnimmt, aber durch Spermidin-haltige Nahrung wieder erhöht werden kann [94, 95].

## 1.5 Neuronale Plastizität

Ein typisches Neuron besteht aus einem Zellkörper, mehreren Dendriten und einem einzelnen Axon. Neurone verfügen über hochentwickelte Kommunikationsstrategien und nutzen Billionen von Synapsen, um eine Informationsübertragung zwischen den Zellen zu ermöglichen [96, 97]. Synapsen bestehen aus einem dichten Netz von Proteinen und sind in die Präsynapse, den synaptischen Spalt und die Postsynapse unterteilt (siehe Abbildung 1.2) [98]. Aus der Präsynapse werden in synaptischen Vesikeln (SV) gespeicherte Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigegeben. Diese binden an spezifische Rezeptoren in der postsynaptischen Membran und lösen eine Signalübertragung aus. Als

neuronale Plastizität wird der Umbau von neuronalen Strukturen in Abhängigkeit von ihrer Funktion bezeichnet. Strukturelle Plastizität ist die Änderung der Anzahl und Organisation der Synapsen oder auch ganzer Axone oder Dendritenbäume. Es wird davon ausgegangen, dass nicht eine Reduktion der Anzahl an Neuronen, sondern der Verlust der neuronalen und dendritischen Architektur zu altersbedingten Defiziten beiträgt [99–101]. Die Beeinträchtigungen der synaptischen Plastizität können somit für die altersabhängige Verschlechterung von Lernen und Gedächtnis von Bedeutung sein [102].



**Abbildung 1.2: Struktureller Aufbau einer exzitatorischen Synapse**

Dargestellt ist der Aufbau einer exzitatorischen Synapse. Sie besteht typischerweise aus einer prä- und einer postsynaptischen Komponente, die durch einen synaptischen Spalt voneinander getrennt sind. Die prä- und postsynaptische Membran besitzen gegenüberliegende elektronendichte Verdickungen, wobei eine präsynaptische Verdichtung, die in Verbindung mit synaptischen Vesikeln (SV) steht, als aktive Zone bezeichnet wird. Die aktive Zone bildet zusammen mit der assoziierten postsynaptischen Dichte (PSD) einen synaptischen Kontakt, an dem die Übertragung von neuronalen Erregungen stattfindet. Je nach Synapsentyp und -größe können an einer Synapse eine oder mehrere hundert synaptische Kontakte vorkommen. Grün umrandet sind die Proteine Synaptophysin und Homer, die im Rahmen der Immunzytochemie dieser Arbeit angefärbt wurden. Abbildung modifiziert nach Serrano et al. [103]

## 1.5.1 Synaptische Plastizität

### 1.5.1.1 Strukturelle Veränderungen der Synapsen im Alterungsprozess

Die interzelluläre Übertragung von Signalen in kortikalen Neuronen ist abhängig von der Qualität und Quantität der Synapsen. Sind diese beeinträchtigt, kann es zu Störungen der zellulären Kommunikation und Plastizität kommen. Grillo et al. zeigten, dass alternde Synapsen weniger stabil sind, was sich in einer erhöhten Bildungs- und Eliminierungsrate von axonalen Boutons (präsynaptische Endknöpfchen) manifestierte. Verglichen mit dem Gehirn junger Erwachsener wiesen große Boutons im gealterten Kortex 10-mal höhere Raten der Destabilisierung und einen 20-mal höheren Umsatz auf [104]. So können kognitive Beeinträchtigungen bei alten Tieren darauf zurückzuführen sein, dass die Aufrechterhaltung stabiler synaptischer Verbindungen im alternden Gehirn beeinträchtigt ist [105]. In einer elektronenmikroskopischen Analyse wurde ein bis zu 30 prozentiger Verlust kortikaler Synapsen in einigen Schichten des präfrontalen Kortex von gealterten Primaten festgestellt. Es zeigte sich eine starke inverse Korrelation zwischen der numerischen Dichte asymmetrischer, meist exzitatorischer Synapsen und der kognitiven Beeinträchtigung [106]. Im Hippocampus von 14 bis 24 Monate alten Ratten nahm die Konzentrationen synaptischer Vesikelproteine wie Synaptophysin und SNAP-25 bei einer Immunoblot-Analyse im Vergleich zu 2 Monate alten Ratten deutlich ab. Da beide Proteine im präsynaptischen Terminal exprimiert werden, deutet dies auf eine altersbedingte Abnahme der Präsynapsen hin [107]. Auch der Gehalt an postsynaptischen Proteinen ist im Hippocampus älterer Ratten (26 Monate) verringert. Somit unterliegen sowohl präsynaptische als auch postsynaptische Terminale dem Alterungsprozess [105, 108].

### 1.5.1.2 Der Einfluss Spermidins auf die synaptische Plastizität

Es wird vermutet, dass die altersbedingte Beeinträchtigung des Gedächtnisses mit der Herunterregulierung Autophagie-assoziiierter Faktoren zusammenhängt. Darüber hinaus wird angenommen, dass eine Induktion von Autophagieprozessen für die Bildung neuer Erinnerungen unentbehrlich ist [109, 110]. Maglione et al. haben in CA3 des Mäusehippocampus eine altersbedingte Abnahme der synaptischen Vesikeldichte und der Mitochondrienhäufigkeit festgestellt. Eine diätische Spermidingabe wirkte schützend vor den altersbedingten synaptischen Veränderungen und stellte die defekte Langzeitpotenzierung an hippocampalen Moosfasern teilweise wieder her [111]. In *Drosophila melanogaster* wird die präsynaptische aktive Zone, ein Kompartiment in dem viele Vesikel mit der Zellmembran fusionieren und Transmitter freigesetzt werden, mit zunehmendem Alter größer und die Transmitterausschüttung nimmt zu. Diese altersbedingten Veränderungen konnten durch eine Fütterung mit Spermidin vollständig unterdrückt werden [60].

## 1.5.2 Dendritische Verzweigung

Dendriten sind feine plasmatische Verästelungen des Zellkörpers und können eine Länge von einigen hundert Mikrometern entwickeln. Primäre Dendriten entspringen direkt dem Soma eines Neurons. Von diesen zweigen sich sekundäre Dendriten ab. Die Muster der dendritischen Verzweigung bestimmen die Art und den Umfang der Innervation, die ein Neuron erhält. Eine starke Verzweigung wird als Zeichen von Komplexität angesehen, da sie eine größere Anzahl von synaptischen Verbindungen zulässt. Ihr Wachstum ist sehr dynamisch und reagiert stark auf Umweltsignale wie Leitmoleküle oder Aktivitätsmuster [112, 113].

Von Autopsieproben des parahippocampalen Gyrus von Menschen mittleren Alters und älterer Menschen mit und ohne Alzheimer wurden die dendritischen Verzweigungen gemessen. Bei nicht dementen älteren Personen waren die dendritischen Verzweigungen umfangreicher als bei Personen mittleren Alters. Im gesunden Zustand wurde somit eine Zunahme der dendritischen Verzweigungen im Alter beobachtet, während bei Patienten mit seniler Demenz die dendritischen Verzweigungen weniger ausgedehnt waren als bei der Vergleichsgruppe mittleren Alters. Die Ergebnisse liefern morphologische Hinweise auf die Verringerung der Dendritenverzweigung bei Demenz und zeigen gleichzeitig die Plastizität im alten menschlichen Gehirn [114].

Derzeit gibt es nur begrenzte Daten zur Auswirkung von Spermidin auf das Dendritenwachstum. Chu et al. verletzten Axone von Hippocampus-Neuronen der Ratte durch Bestrahlung und untersuchten die Auswirkungen der Polyamine auf die Neuroregeneration. Spermin und Spermidin förderte die axonale Neubildung an der verletzten Stelle erheblich [115]. In Anbetracht ihrer zahlreichen strukturellen und funktionellen Unterschiede unterscheiden sich Axon und Dendrit in ihrer Entwicklung [116]. Deswegen kann aktuell nicht von einem ähnlichen Effekt von Polyaminen auf dendritisches Wachstum ausgegangen werden.

## 1.6 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die kurzfristigen Auswirkungen von Spermidin und der Hypusinierung des eIF5A auf die neuronale Plastizität alternder Zellen zu untersuchen. Dafür wurden zwei experimentelle Ansätze verfolgt. Im ersten Experiment wurden 50  $\mu$ M Spermidin über einen Zeitraum von 24 und 48 Stunden zu 21, 42 und 84 Tage alten primären neuronalen Zellkulturen der Ratte gegeben. Aktuelle genetische Studien haben Hinweise darauf geliefert, dass bestimmte Varianten im eIF5A oder DHPS-Gen mit seltenen neurologischen Entwicklungsstörungen beim Menschen in Verbindung stehen. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung der einzelnen Schritte des Hypusin-Modifikationswegs und insbesondere die kritische Funktion des hypusinierten eIF5A bei der neurobiologischen Entwicklung

des Menschen [117–119]. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit das Ziel gesetzt, eine eingehende Untersuchung der Hypusinierung des eIF5A durchzuführen. Um die Rolle der Hypusinierung des eIF5A weiter zu analysieren wurde in einer zweiten Experimentreihe die Konzentration, der an der Modifikation beteiligten DHPS in Neuronen kortikaler Primärkulturen der Ratte verändert. Zu diesem Zweck wurde die Methode der RNA-Interferenz für einen langfristigen *knock-down* des Zielproteins verwendet. Es wurde eine kurze Haarnadel-RNA (*short hairpin* RNA; shRNA) für die DHPS konstruiert und in einen FUGWH1-Vektor kloniert [120, 121]. Darüber hinaus wurde ein Überexpressionskonstrukt der DHPS unter Verwendung eines FUGW-Vektors konstruiert. Die Plasmide wurden über lentivirale Transduktion in die Zielzellen eingebracht. Anschließend wurden die Dendritenverzweigungen und Prä- und Postsynapsen quantifiziert.

Somit fokussiert sich das Projekt auf folgende Fragestellungen:

- Welchen Einfluss hat eine externe Spermidin-Supplementierung auf die Morphologie von Neuronen (z.B. Dendritenverzweigungen) unterschiedlichen Alters sowie die Anzahl von Prä- und Postsynapsen an primären Dendriten?
- Was bewirken eine Überexpression und ein *knock-down* der DHPS in Bezug auf die Anzahl der Dendritenverzweigungen sowie von Prä- und Postsynapsen an primären Dendriten?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen: Cell Signaling, Gibco, Merck, Invitrogen, Roche, Roth, Sigma Aldrich®, Thermo Fisher Scientific. Roti®CELL Wasser (Carl Roth, Kat. Nr. 9186.2) wurde für proteinbiochemische Experimente verwendet. Für alle anderen Anforderungen, wie z.B. die Puffervorbereitung, wurde bi-destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) aus dem Milli Q-System von Millipore (Merck Millipore, Kat. Nr. Y00Q0V0WW) genutzt. Die verwendeten Chemikalien und Lösungen werden zu Beginn des jeweiligen Methodenabschnitts genannt.

#### 2.1.2 Tiere

Zur Herstellung der primären kortikalen Zellkulturen wurden Ratten (*Rattus norvegicus*) des Wistar Stammes verwendet. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte entsprechend der Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt; Lizenz-Nr. 42505-2-1507 UniMD Germany in Übereinstimmung mit der European Communities Council Directive; 86/609/EEC).

Die Ratten wurden in Gruppen von 5-6 Tieren, bei einer konstanten Temperatur von 22±2 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 50 %, einem regelmäßigen 12 h Hell-Dunkel Rhythmus (Licht an 6-18 Uhr) und mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten.

#### 2.1.3 Bakterienstämme und Nährmedien

Für die Transformationen und Plasmidpräparationen wurde der Bakterienstamm XL10-Gold (Stratagene) mit dem Genotyp *endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetR Amy CmR)* verwendet. Die Bakterien wurden in LB-Medium oder auf Agarplatten gezüchtet, welche Ampicillin oder Kanamycin enthielten.

Tabelle 2.1: Bakterien Medien

| Medium     | Inhaltsstoffe   |
|------------|---|
| LB-Medium  | 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Trypton, 5 g/l NaCl  |
| LB-Platten | 1000 ml LB-Medium, 15 g Agar  |
| SOC-Medium | 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM MgSO <sub>4</sub> , 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM Glukose |



## 2.1.4 Antikörper

### 2.1.4.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2.2: Primäre Antikörper

| Antikörper                  | Spezies | Verdünnung             | Hersteller            | Katalognummer |
|-----------------------------|---------|------------------------|-----------------------|---------------|
| $\alpha$ -Homer 1           | rb      | IF 1:1000              | Synaptic System       | 160003        |
| $\alpha$ -Synaptophysin1    | gp      | IF 1:1000              | Synaptic System       | 101004        |
| $\alpha$ -MAP 2             | ch      | IF 1:1000              | Invitrogen            | PA1-16751     |
| $\alpha$ -MAP 2             | ms      | IF 1:1000              | Sigma-Aldrich®        | M4403         |
| $\alpha$ -DHS C7            | ms      | WB 1:1000              | Santa-Cruz Technology | sc-376580     |
| $\alpha$ - GFP              | rb      | IF 1:1000              | Abcam                 | ab 290        |
| $\alpha$ - GFP              | ch      | IF 1:1000<br>WB 1:2000 | Abcam                 | ab 13970      |
| $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin | rb      | WB 1:2000              | Abcam                 | ab 52901      |
| $\alpha$ - $\beta$ -Actin   | rb      | WB 1:2000              | Cell Signaling        | 8457          |

### 2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2.3: Sekundäre Antikörper

| Antikörper   | Spezies | Verdünnung | Hersteller             | Katalognummer |
|--|---------|------------|------------------------|---------------|
| $\alpha$ -rabbit IgG (H+L)<br>Alexa Fluor 488      | dk      | IF 1:2000  | Invitrogen             | A-21206       |
| $\alpha$ -mouse IgG (H+L)<br>Cy <sup>TM</sup> 3    | dk      | IF 1:2000  | Jackson ImmunoResearch | 715-165-150   |
| $\alpha$ - guinea pig IgG (H+L)<br>Alexa Fluor 647 | dk      | IF 1:2000  | Jackson ImmunoResearch | 706-605-148   |
| $\alpha$ -chicken IgG (H+L)<br>Cy <sup>TM</sup> 3  | dk      | IF 1:2000  | Jackson ImmunoResearch | 703-165-155   |
| $\alpha$ -rabbit IgG, (HRP)<br>conjugated          | dk      | WB 1:7500  | Jackson ImmunoResearch | 115-035-152   |
| $\alpha$ -mouse IgG, HRP<br>conjugated             | gt      | WB 1:7500  | Jackson ImmunoResearch | 115-035-146   |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Neurale Primärkulturen aus embryonalen (E18) Ratten-Cortices

Verwendete Chemikalien:

- DMEM<sup>3+</sup>: DMEM, 10 % (v/v) FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin
- NB<sup>+</sup>: Neurobasal<sup>TM</sup>, 1x B27, 0,8 mM L-Glutamin
- Waschpuffer: HBSS mit Phenolrot-Zusatz
- Trypsin: 10x 2,5 % (w/v) Trypsin (-EDTA)
- DNase I: 0,1 % (w/v) (200 U) in HBSS, 2,4 mM MgSO<sub>4</sub>
- Poly-D-Lysin: 100 mg/ml in 0,15 M Borsäure pH 8,4

Analog zu Banker und Goslin erfolgte die Generierung primärer Zellkulturen aus embryonalen Ratten-Cortices [122]. Für die Herstellung der Zellkulturen wurden schwangere Ratten mit Isofluran (Baxter GmbH) tief anästhesiert und anschließend mittels einer Tierguillotine dekapitiert. Die Embryonen wurden im Entwicklungsstadium E18 dekapitiert, das Gehirn in HBSS freipräpariert und vom übrigen Hirngewebe getrennt. Nach zwanzigminütiger Inkubation mit 1x Trypsin bei 37 °C, dreimaligem Waschen mit HBSS und Zugabe von 0,4 ml einer 0,1 %igen DNase I-Lösung wurde das Kortexgewebe durch mehrfaches Aufziehen mit 21 G und 25 G Kanülen weiter homogenisiert. Anschließend erfolgte die Filtration durch eine 0,45 µm Membran und Verdünnung der Zellen in DMEM<sup>3+</sup>. Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen auf mit Poly-D-Lysin behandelte Deckgläser in einer Dichte von 20.000 oder 40.000 Zellen pro Deckgläschen einer 12- oder 24-Well-Platte ausgesät. 3 h nach der Präparation wurde DMEM<sup>3+</sup> gegen NB<sup>+</sup> ausgetauscht. Alle sieben Tage wurden die Kulturen mit 10 Volumenprozent frischem NB<sup>+</sup> gefüttert.

Die Tötung der Muttertiere, Embryonenentnahme und Präparation der Primärkulturen wurden von Mitarbeiter\*innen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie mit zertifizierter Qualifikation zur Durchführung von Tierversuchen vorgenommen.

#### 2.2.1.2 Pharmakologische Behandlung neuraler Primärkulturen der Ratte

Verwendete Chemikalien:

- Spermidin: (Sigma Aldrich®)

Für die pharmakologische Behandlung primärer kortikaler Zellen wurde eine 0,64 M Spermidin-Stocklösung mit NB<sup>+</sup> hergestellt. Da durch Fütterung die unterschiedlich alten Zellen pro Well nicht die gleiche Menge an Medium enthielten, wurde das komplette Medium abgenommen und 0,5 ml des

Mediums der zugehörigen Altersgruppe wieder zurückgegeben. Anschließend wurde die entsprechende Menge der Stocklösung direkt ins Kulturmedium pipettiert, um eine finale Spermidinkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  zu erreichen. Die Inkubationszeiten betragen 24 h und 48 h.

### 2.2.1.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Verwendete Chemikalien:

- 1xPBS pH 7,4: 37 mM NaCl, 4,3mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ , 2,7mM KCl, 1,4mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- PLP-Fix: 16 % (w/v) Paraformaldehyd (Alfa Aesar), Lysin Phosphat Puffer (Lysin-HCl, ddH<sub>2</sub>O, 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 M Phosphat-Puffer, pH 7,4), 2.16 % (w/v) D-Glucose, 0.336 % (w/v)  $\text{NaIO}_4$
- B-Block: 10 % (v/v) Pferdeserum, 5 % (w/v) Sucrose, 2 % (w/v) BSA
- 20 % (w/v) Triton X-100
- Polyvinylalkohol Mowiol<sup>®</sup>, pH 8,5

Die Zellen wurden vor der Fixierung einmalig mit PBS gewaschen und dann für 30 min bei RT mit PLP-Fix inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 10 min wurden die Zellen für 2 h bei RT mit B-Block + 0,2 % (w/v) Triton X-100 geblockt. Die Zellen wurden mit in B-Block + 0,2 % (w/v) Triton X-100 gelösten Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen erneut dreimalig mit PBS für 10 min gewaschen und mit den jeweiligen Sekundärantikörpern in B-Block + 0,2 % (w/v) Triton X-100 für 2 h inkubiert. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubationszeit mit DAPI in PBS, woraufhin die Zellen erneut dreimal für 10 min mit PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen einmalig mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Mowiol<sup>®</sup> auf den Objektträgern eingebettet.

### 2.2.1.4 Kultivierung von HEK293T-Zellen

Verwendete Chemikalien:

- Kulturmedium (DMEM<sup>3+</sup>): DMEM, 10 % (v/v) FBS, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin, 2 mM L-Glutamin (alle Gibco)
- 1 x TrypLE<sup>™</sup> Express (Gibco)
- Waschpuffer: HBSS mit Phenolrot (Gibco)
- Poly-D-Lysin: 100 mg/l in 0,15 M Borsäure, pH 8,4 (Sigma Aldrich<sup>®</sup>)

Die humane embryonale Nierenzelllinie (HEK293T) wurde sowohl für die Virenproduktion als auch für Überexpressions- und *knock-down*-Experimente in eukaryotischen Zellen verwendet. Die Zellen wurden in Zellinkubatoren (Heraeus oder Thermo Fisher Scientific) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert und zweimal pro Woche passagiert. Dabei wurden die Zellen nach einem Waschschrift in warmem HBSS, welches 1 x TrypLE<sup>™</sup> Express enthielt, für weitere 3 min gelöst und ein Zehntel der Zellen in eine neue Kulturflasche übertragen.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Chemische Transformation von *E. coli*

Verwendete Chemikalien:

- SOC-Medium
- LB-Agar-Platten
- Verwendete Vektoren: FUGW-Leervektor, FUGW-DHPS, FUGWH1-DHPS-shRNA, FUGWH1-*scrambled*-shRNA, pEGFP-DHPS

Für die Transformation von *E. coli* XL10-GOLD wurden 1 µl Proben-DNA zu 50 µl Bakterien gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 s bei 42 °C wurden die Proben für 2 min auf Eis gelegt bevor sie in 500 ml vorgewärmtes SOC-Medium überführt wurden. Die Bakterien wurden bei 37 °C für 50 min geschüttelt, anschließend auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die LB-Platten mit den jeweiligen Bakterienkolonien konnten bei 4 °C für weitere Experimente gelagert werden.

### 2.2.2.2 Plasmidpräparation

Verwendete Chemikalien:

- Macherey-Nagel™ Plasmid (NoLid)
- Macherey-Nagel™ NucleoBond™ Xtra Midi EF
- LB-Medium
- Ampicillin 100 µg / ml

Um nach der Transformation die positiven Klone zu bestimmen, wurde eine „Mini-Prep“ durchgeführt. Dafür wurden geerntete Kolonien in 2 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 37 °C über Nacht kultiviert und am folgenden Tag die Plasmidextraktion nach dem Protokoll von Macherey-Nagel™ Plasmid (NoLid) durchgeführt. Zur Amplifizierung der erfolgreichen Klone erfolgte eine „Midi-Prep“. Kolben mit 250 ml LB-Medium, welches 500 µl Ampicillin und die transformierten *E. coli* XL10-Gold Kulturen enthielt, wurden über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Hier erfolgte die Plasmidextraktion nach dem Protokoll von Macherey-Nagel™ NucleoBond™ Xtra Midi EF.

### 2.2.2.3 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA

Verwendete Chemikalien:

- Restriktionsenzym: BamHI (Thermo Fisher Scientific)
- 10x BamHI-Puffer (Thermo Fisher Scientific)

Für den Restriktionsverdau wurden 17,3 µl ddH<sub>2</sub>O, 2 µl der Probe, 0,2 µl des Restriktionsenzym BamHI und 2,5 µl des 10x Bam-Puffers in ein 1,5 ml Eppendorfer Reaktionsgefäß geben und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.2.4 Gelelektrophorese mit Agarose-Gel

Verwendete Chemikalien:

- Agarose-Gel: 1 % (w/v) Biozym LE Agarose (Biozym Scientific GmbH) in 60 ml 1x TAE-Puffer, 3,6 µl Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe; für größere Gele, wurde die doppelte Menge verwendet)
- 50x TAE-Puffer: Tris-Base (242g), Essigsäure (57,1 ml), 0,5 M EDTA (pH: 8,0) (100 ml), auf ein Liter mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt
- Marker: 1 kb DNA-Ladder

25 µl der Proben wurden auf das 1 %ige (w/v) Agarose-Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese fand bei 85 V für 60 min statt. Die Visualisierung der DNA im Gel erfolgte mittels UV-Licht.

#### 2.2.2.5 Transfektion der HEK293T-Zellen

Verwendete Chemikalien:

- Lösung A: 500 mM CaCl<sub>2</sub>
- Lösung B: 140 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Kulturmedium (DMEM<sup>3+</sup>): DMEM, 10 % (v/v) FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin (alle Gibco)
- Vektoren: pEGFP, pEGFP-DHPS, FUGWH1-DHPS-shRNA, FUGWH1-*scrambled*-shRNA

Für die Analyse eines effektiven *knock-downs* wurde der pEGFP-DHPS Vektor alleine oder in Kombination mit den Vektoren FUGWH1-DHPS-shRNA bzw. FUGWH1-*scrambled*-shRNA mittels Calciumphosphatmethode in HEK293T-Zellen transfiziert. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesät. Für die Transfektion wurden 150 µl Lösung A mit 2 µg DNA gründlich gemischt. Zu dieser Mischung wurden 150 µl der Lösung B hinzugefügt und genau 1 min bei RT inkubiert. Tropfen für Tropfen wurden 300 µl des gebildeten Präzipitats je Well zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden 4 h lang bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und 2 ml frisches, vorgewärmtes Medium hinzugefügt. 24 Stunden später wurden die HEK293T-Zellen jeweils mit 1 ml, 4 °C kalten PBS gewaschen und anschließend in 400 µl 1xSDS-Probenpuffer mit einem Zellschaber geerntet.

#### 2.2.2.6 Präparation der Lentiviren

Verwendete Chemikalien:

- Vektoren: FUGW-Leervektor, FUGW-DHPS, FUGWH1-DHPS-shRNA, FUGWH1-*scrambled*-shRNA, pCMV-VSV.G (Addgen), psPAX2 (Addgen)
- Lösung A: 500 mM CaCl<sub>2</sub> in ddH<sub>2</sub>O
- Lösung B: 140 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in ddH<sub>2</sub>O

- DMEM<sup>3+</sup>: DMEM, 10 % oder 4 % (v/v) FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin (alle Gibco)
- DMEM<sup>2+</sup>: DMEM, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin (alle Gibco)
- NB<sup>+</sup>: Neurobasal<sup>TM</sup>, 1x B27, 0,8 mM L-Glutamin (alle Gibco)
- Corning<sup>®</sup> 250 ml Vakuum Filter/ Vorratsflaschensystem, 0,45 µm Pore 19,6 cm<sup>2</sup> CA-Membran

Das Design der *knock-down*- und Überexpressionskonstrukte erfolgte durch Klonierung entsprechender RNA-Fragmente in den von Lois et al. beschriebenen Vektor FUGW und den FUGWH1 Vektor [123, 124]. Diese Schritte wurden von M.Sc. Natalia Waal durchgeführt.

Zur Generierung der Viren fand eine transiente Transfektion von HEK293T-Zellen mittels Calciumphosphat Methode unter S2 Sicherheitsbedingungen statt [125, 126]. Dabei wurden die Transfervektoren zusammen mit den Helferplasmiden für die Virushülle psPAX2 und pVSVg in einer Ratio von 28,6 µg/14,3 µg/7,14 µg zu 3 ml Lösung A hinzugegeben. Diese wurde tropfenweise zu 3 ml Lösung B hinzugeben, kurz mittels Vortex gemischt und für eine min inkubiert. 1 ml der Lösung wurde auf die HEK293T-Zellen einer 75 cm<sup>2</sup> Flasche getropft und für 6-8 h inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte mit 10 %igem (v/v) FBS in DMEM<sup>3+</sup>. Pro Ansatz und Konstrukt wurden 5 Flaschen transfiziert. Am folgenden Tag wurden 7 ml des Mediums durch 5 ml DMEM<sup>2+</sup> ersetzt. 24 Stunden später wurde für die erste Ernte das Medium entnommen und bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand bei 4 °C gelagert. 8 ml 4 %iges (v/v) FBS in DMEM<sup>3+</sup> wurden wieder zu den Zellen gegeben. Für die zweite Ernte wurde das Medium am nächsten Tag erneut abgenommen und für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde gemeinsam mit dem vom Vortag durch eine 0,45 µm Membran filtriert und anschließend bei 75000 x g bei 4 °C für 2 h zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Viren mit 50 µl NB<sup>+</sup> für 40 min bei 300 rpm resuspendiert. Die Virensuspension wurde aliquotiert und bei - 80 °C gelagert.

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte mittels HEK293T-Zellen in einer 96-Well-Platte. Die Virus-enthaltende Stocklösung wurden zu einem Titer von 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-9</sup> in DMEM<sup>3+</sup> verdünnt. Von den jeweiligen Verdünnungen wurde zur Dreifachbestimmung jeweils 10 µl pro Well zu den Zellen gegeben. Am nächsten Tag folgte ein Mediumwechsel mit 200 µl DMEM<sup>3+</sup> und weitere 24 h später wurden die GFP-positiven (infizierten) HEK293T-Zellen ausgezählt. Die Berechnung der Viruskonzentration erfolgte anhand folgender Formel:

$$\frac{\text{GFP positive Zellen} * \text{Verdünnung}}{10 \mu\text{l}} = \text{Virus} / \mu\text{l Stocklösung}$$

### 2.2.2.7 Infektion neuraler Primärkulturen mit Lentiviren

Die primären kortikalen Zellkulturen wurden an DIV 3 infiziert. Dafür wurde eine Verdünnung von  $10^{-3}$  von jedem Konstrukt hergestellt. 10  $\mu$ l dieser Verdünnung wurden mit 490  $\mu$ l frischem NB<sup>+</sup> Medium vermischt. Von den Neuronen wurden 500  $\mu$ l des konditionierten Mediums abgenommen und aufbewahrt. Die 500  $\mu$ l der Virusverdünnung wurden zu den Zellen gegeben. Somit bestand schlussendlich eine Verdünnung von  $10^{-5}$ . Bei einem Virustiter von ca. 4.000.000/ $\mu$ l entsprach dies bei 40.000 Zellen pro Well einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von 10. 24 h später wurde das komplette Medium abgenommen und 500  $\mu$ l des konditionierten Mediums und 500  $\mu$ l frisches Medium zu jedem Well hinzugegeben. An DIV 21 wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung fixiert. Für die Expressionsanalyse der DHPS wurden die Zellen mit 1 ml, 4 °C kalten PBS gewaschen und anschließend mit 80  $\mu$ l 1xSDS-Probenpuffer mit einem Zellschaber geerntet. Eine erfolgreiche Transduktion war an einem positiven GFP-Signal erkennbar.

## 2.2.3 Biochemische Methoden

### 2.2.3.1 Amidoschwarz Proteinbestimmung

Verwendete Chemikalien:

- Referenzstandard: 0,5 mg/ml Bovines Serum Albumin (BSA, Carl Roth, cat. no. 8076.5)
- Färbelösung: 1,44 % (w/v) Amidoschwarz in Waschlösung
- Waschlösung: 90 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
- 0,1 M NaOH

Die Proteinmenge der verwendeten Proben wurde mit Hilfe des Amidoschwarz-Assays bestimmt [127]. Zur Bestimmung der Eichkurve wurde in Dreifachbestimmung die Referenzlösung entsprechend Tabelle 2.4 in eine 96-Well-Platte (Eppendorf AG, Kat. Nr.: 951040005) pipettiert. 2  $\mu$ l oder 5  $\mu$ l der Proben wurden mit 98  $\mu$ l oder 95  $\mu$ l Roth-Wasser als Triplett aufgetragen. Anschließend wurde zu jedem Well 200  $\mu$ l Amidoschwarzlösung hinzugefügt. Nach zehnmütiger Inkubation bei RT wurde die Well-Platte für 10 min bei 3200 g zentrifugiert (Eppendorf AG, Zentrifuge 5810R). Die überstehende Amidoschwarzlösung wurde abgossen und das Pellet mit 300  $\mu$ l Methanol-Essigsäure gewaschen. Die Zentrifugation und Waschschrte wurden noch einmal wiederholt. Das entstandene Pellet wurde für 30 min bei 37 °C getrocknet und dann unter Schütteln mit 300  $\mu$ l 0,1 M NaOH resuspendiert. Anschließend folgte eine photometrische Absorptions-Messung bei einer Wellenlänge von 620 nm mit dem Photometer Infinite F50 (Tecan). Die Absorptionsstärke wurde mit der BSA-Eichkurve verglichen, um den Proteingehalt zu ermitteln und mit Magellan (Tecan, Version 2.0) dargestellt. Aus der Dreifachbestimmung wurde ein Mittelwert berechnet.

Tabelle 2.4: Pippetierschema des BSA-Standards

| Reihe    | Stammlösung<br>in $\mu\text{l}$ | Roth-Wasser in<br>$\mu\text{l}$ | BSA in $\mu\text{g}$ |
|----------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| <b>A</b> | 0                               | 100                             | 0                    |
| <b>B</b> | 4                               | 96                              | 2                    |
| <b>C</b> | 8                               | 92                              | 4                    |
| <b>D</b> | 16                              | 84                              | 8                    |
| <b>E</b> | 24                              | 76                              | 12                   |
| <b>F</b> | 32                              | 68                              | 16                   |
| <b>G</b> | 40                              | 60                              | 20                   |

### 2.2.3.2 SDS-Page und Western Blot

Verwendete Chemikalien:

- 1 x Elektrophorese-Puffer: 25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
- 1 x SDS-Puffer: 0,25 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 62,5 mM Tris pH 6,8, 0,001 % Bromphenolblau
- Marker: PageRuler (Fermentas),
- 1 x Western-Blot-Puffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,02 % (w/v) SDS
- PonceauS-Färbelösung: 5 % (w/v) PonceauS, 3 % (v/v) Essigsäure
- 1 x TBS: 20 mM Tris-Base, 0,8 % (w/v) NaCl
- 1 x TBS-T: 20 mM Tris-Base, 0,8 % (w/v) NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20
- 1 x TBS-A: 20 mM Tris-Base, 0,8 % (w/v) NaCl, 0,02 % (w/v) Na-Azid
- 5 % (w/v) Trockenmilch in TBS/ TBS-T
- Nitrozellulosemembran (Protran BA85, 0,22  $\mu\text{m}$ , Li-Cor Biosciences, Kat.Nr.: 926-31092)
- ECL Pierce<sup>TM</sup>Detektionslösung, Pierce<sup>TM</sup>SuperSignal West Femto (ThermoFisher Scientific)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli durchgeführt [128]. Entsprechend der Tabelle wurden die Tris-Glycin-Gele mit einem Gradienten von 5-20 % Acrylamid hergestellt. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt, mit Elektrophoresepuffer geflutet und mit 30  $\mu\text{g}$  Protein pro Spur beladen. Bei einer konstanten Stromstärke von 12 mA pro Gel wurden die Proteine entsprechend ihrer molekularen Größe separiert.

Um die Proteine für eine Immundetektion zugänglich zu machen, wurden sie auf eine Nitrozellulosemembran übertragen [129]. Dafür wurden die Gele im Sandwich-Verfahren mit



Filterpapier und Schwamm umschichtet und in die mit Western-Blot-Puffer befüllten Kammern gehängt. Der Proteintransfer wurde für 90 min bei 200 mA und einer konstanten Temperatur von 4 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen zur Proteinvisualisierung für 10 min mit Ponceau-Lösung gefärbt. Die Farbreste wurden durch mehrmaliges Waschen mit ddH<sub>2</sub>O entfernt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, erfolgte eine vorherige Blockierung mittels 5 % fettfreier Trockenmilch in TBS bei RT für eine Stunde. Nach zweimaligem Waschen mit TBS, wurden die primären Antikörper (1:2000 in TBS-T) über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Membranen 10 min mit 1xTBS, 10 min mit 1xTBS-T, 5 min mit 1xTBS-T und 5 min mit 1xTBS gewaschen. Der entsprechende HRP-konjugierte sekundäre Antikörper (1:7500 in 5 % Milch in TBS-T) wurde für zwei Stunden bei RT unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte das gleiche Waschschemata erneut.

Die Membranen wurden mit den Detektionslösungen ECL und Femto gemäß den Anweisungen des Herstellers entwickelt. Schließlich wurde die Chemilumineszenz mit dem Odyssey Fc-Lumineszenz-Detektor (LI-COR® Biosciences GmbH, Modell: 2800) erfasst, wobei die Belichtungszeit für die Proteine auf 10 min und für das als Kontrolle verwendete  $\beta$ -Actin oder  $\beta$ -Tubulin auf 5 min eingestellt wurde. Die Quantifizierung der Chemilumineszenz-Intensitäten erfolgte mit der Image Studio Lite Software (LI-COR® Biosciences GmbH, Version 5.2.5). Die detektierten Proteinbanden wurden markiert und deren Graustufenwert ermittelt. Die Probensignale wurden auf die korrespondierenden  $\beta$ -Actin oder  $\beta$ -Tubulin Signale normiert und der relative Prozentwert der Signale in Bezug auf die Kontrolle ermittelt.

Tabelle 2.5: Zusammensetzung 5-20 % Polyacrylamid-Tris-Glycin Gradienten-Gele

| Bestandteil  | Sammelgel in ml | Trenngel 20% in ml | Trenngel 5% in ml |
|--|-----------------|--------------------|-------------------|
| 1,8 M Tris-HCl, pH 8.8                             | -               | 6,84               | 6,84              |
| 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8                             | 9               | -                  | -                 |
| ddH <sub>2</sub> O                                 | 11,88           | 1,392              | 18,94             |
| 87 % Glycerol                                      | 8,28            | 7,2                | 1,8               |
| 40 % (v/v) Acrylamid +<br>0,8% (w/v) Bis-Acrylamid | -               | 16,2               | 4,056             |
| Acrylamid 30 %<br>Rotiphorese® Gel 30              | 5,76            | -                  | -                 |
| 0,2 M EDTA   | 0,360           | 0,3168             | 0,3168            |
| 10 % SDS   | 0,360           | 0,3168             | 0,3168            |
| TEMED  | 0,0273          | 0,0216             | 0,0216            |

| Bestandteil          | Sammelgel in ml | Trenngel 20% in ml | Trenngel 5% in ml |
|----------------------|-----------------|--------------------|-------------------|
| APS                  | 0,2223          | 0,072              | 0,1152            |
| 0,8 % Bromphenolblau | -               | 0,150              | -                 |
| 0,5 % Phenolrot      | 0,175           | -                  | -                 |

## 2.2.4 Bildgebung

Die Bilder der Neurone für die Sholl-Analyse wurden unter Verwendung des Objektivs HC PL Apo 20x/0.80 WD 0.4mm eines Leica DM6 B Fluoreszenzmikroskops mit einer Leica DFC7000 GT Farbkamera erstellt.

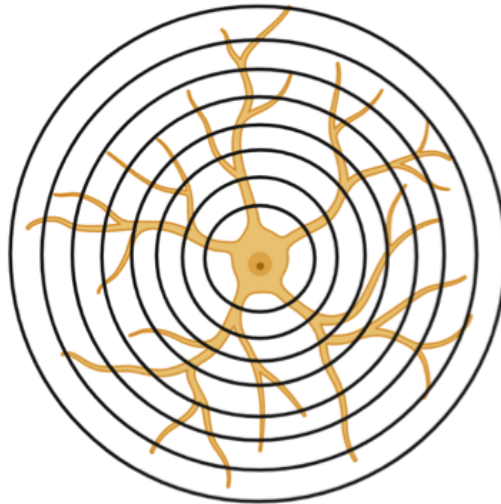
Für die Quantifizierung der Prä- und Postsynapsen wurden große, vereinzelte Neurone mit einem gut erkennbaren primären Dendriten, der nicht von anderen Dendriten überlagert wurde, aufgenommen. Dafür wurde ein konfokales Mikroskop Axioplan 2 imaging (Carl-Zeiss Jena) Objektiv EC Plan Neofluar 63x/1.40 Oil DIC M27 (AA=0.19mm) genutzt. Die serielle Aufnahme zwischen den x- und y-Achsen ausdehnenden konfokalen Ebenen in der z-Achse bezeichnet man als z-Stack. Diese ermöglicht die Sammlung dreidimensionaler Informationen über das Untersuchungsobjekt [130]. Die z-Stack-Bilder wurden mit der CCD-Kamera Spot RT und der Software ZEN 2012 SP5 FP1 (schwarz) (Carl-Zeiss Jena, Version 14.0.9.201) erstellt.

Die Wellenlänge der Exzitation wurde entsprechend der verwendeten Fluorophore gewählt. Innerhalb eines Experiments wurden die Parameter des Aufnahmemodus beibehalten, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Für jede Kondition wurden 20-30 Bilder generiert mit jeweils 5-10 Bildern pro Coverslip, wovon 15 Bilder analysiert wurden.

## 2.2.5 Bildanalysen

### 2.2.5.1 Sholl-Analyse

Für die Analyse der Intersektionen der Neurone (Sholl-Analyse) wurden FIJI und das Plugin Simple Neurite Tracer (SNT) verwendet [131–133]. Die Bilder der MAP 2 Färbung wurden auf 8 Bit reduziert und dann die Funktion Sholl-Analyse angewendet. Die Software legt dabei vom Zellkern bis zum längsten Dendriten Ringe im Abstand von 10  $\mu\text{m}$  über das Neuron. Somit kann die Anzahl der Schnittpunkte mit den Ringen und der Abstand vom Zellkern ermittelt werden (siehe Abbildung 2.1).



### **Abbildung 2.1: Darstellung der Sholl-Maske**

Die Quantifizierung kann durch Überlagerung einer Reihe konzentrischer Kreise mit stetig zunehmendem Radius um das Soma des Neurons vorgenommen werden. Erstellt mit BioRender.com

#### **2.2.5.2 Quantifizierung der Prä- und Postsynapsen**

Für die Analyse der Prä- und Postsynapsen wurde das Program FIJI mit dem Plugin SynQuantVid von Wang et al. verwendet [134]. Die Bilder der MAP 2, Homer 1 und Synaptophysin 1 Färbung wurden in 8 Bit konvertiert. Es wurde ein Rechteck erstellt und über den primären Dendriten der MAP 2 Färbung gelegt. Mit dem Befehl „Restore Selection“ wurde das Rechteck in der gleichen Position auf die Bilder, der Homer 1 und Synaptophysin 1 Färbung gelegt. Anschließend wurde das Plugin SynQuantVid angewendet, welches Anzahl, Größe und Intensität der Punkte in der prä- und postsynaptischen Färbung zählt. Somit konnten die Anzahl, Größe und Intensität der Prä- und Postsynapsen sowie eine Co-Lokalisation von beiden quantifiziert werden. Für jedes Experiment wurde derselbe Schwellenwert verwendet, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

#### **2.2.6 Statistik**

Die Daten wurden mit GraphPad Prism Version 8 (GraphPad Inc., USA) statistisch ausgewertet. Die Auswertung der Sholl-Analysen erfolgte mittels Two-Way ANOVA Varianzanalyse und anschließendem Turkey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest. Für die Analyse der prä- und postsynaptischen Signale wurde eine One-Way ANOVA Varianzanalyse gefolgt von einem Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt [135]. Für die Auswertung der Western-Blots wurde ein ungepaarter t-Test nach Student zwischen gleichen Konzentrationen verwendet [136]. Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Ein p-Wert von  $<0.05$  galt in allen Quantifizierungen als signifikant (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ), wie im Detail in den Legenden der Abbildungen im Abschnitt Ergebnisse angegeben.

## 3 Ergebnisse

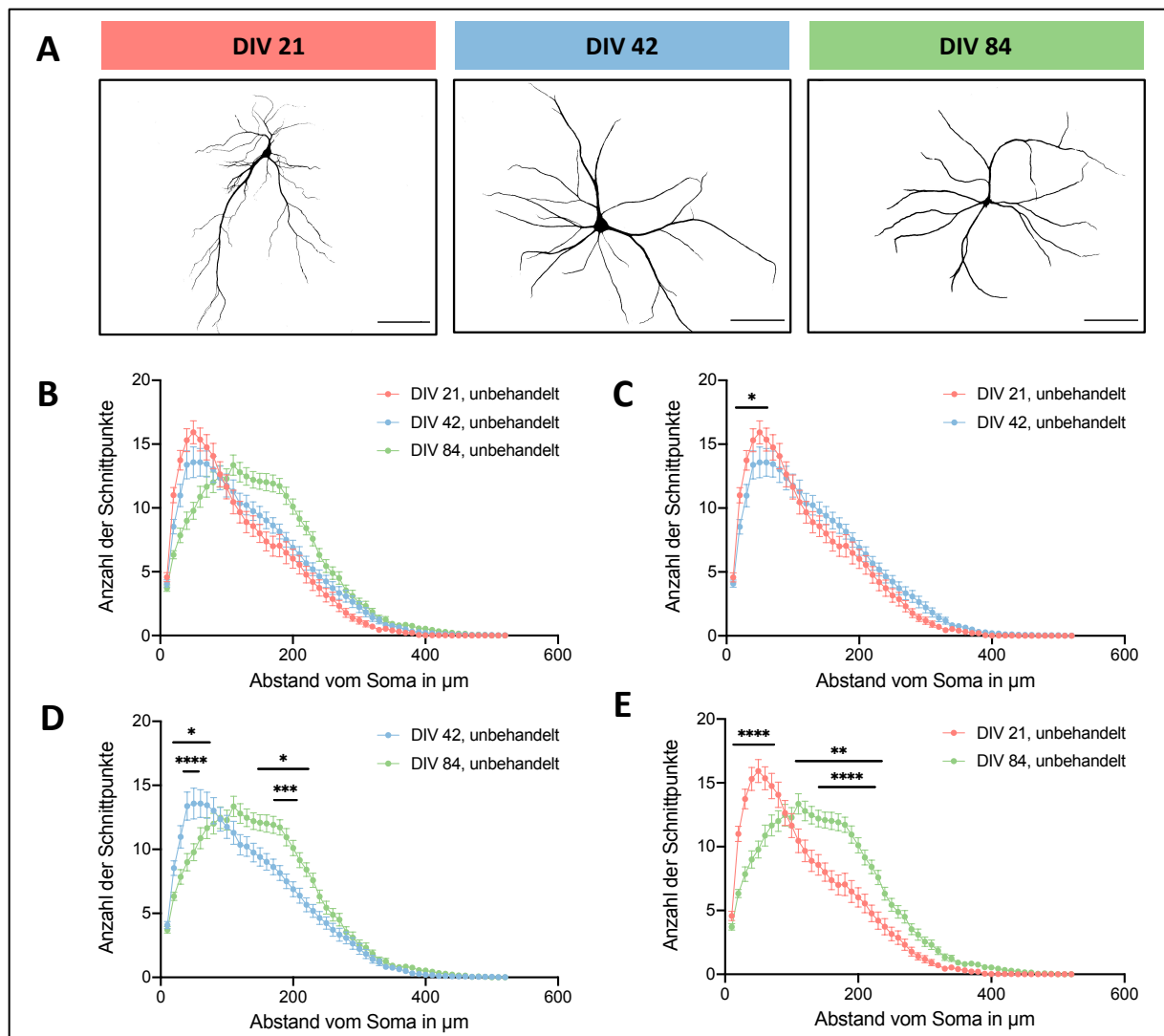
Ziel der Arbeit war es den Einfluss Spermidins auf die Morphologie der Dendriten sowie die Architektur der Synapsen kortikaler Primärkulturen unterschiedlichen Alters festzustellen. Zudem wurde der Einfluss des für die Hypusinierung des eIF5A notwendigen Enzyms DHPS auf die Morphologie der Dendriten und Synapsen an kortikalen Primärkulturen der Ratte untersucht. Somit teilt sich die Arbeit in zwei Experimentreihen. Zum einen die morphologische Charakterisierung altersabhängiger Veränderungen von Neuronen kortikaler Primärkulturen der Ratte und deren Beeinflussung durch Spermidin-Supplementierung und zum anderen die morphologische Analyse kortikaler Primärneurone *in vitro* nach lentiviraler Überexpression oder *knock-down* der DHPS einem essentiellen Enzym der Hypusinierung des eukaryotischen Elongationsfaktors eIF5A.

### 3.1 Morphologische Charakterisierung altersabhängiger Veränderungen von Neuronen kortikaler Primärkulturen der Ratte und deren Beeinflussung durch Spermidin-Supplementierung

#### 3.1.1 Sholl-Analyse alternder Neurone *in vitro*

Zu Beginn wurden die morphologischen Veränderungen der Neurone im Laufe der Alterung *in vitro* analysiert. Zur Bestimmung der Anzahl an dendritischen Verzweigungen wurde die seit 1953 etablierte Sholl-Analyse (siehe Kapitel 2.2.5.1) verwendet [132]. Es wurden drei Zeitpunkte berücksichtigt: DIV 21, 42 und 84. Sie stellen den Unterschied zwischen jungen erwachsenen (DIV 21), älteren erwachsenen (DIV 42) und sehr alten Neuronen (DIV 84) dar.

Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, nahm die dendritische Arborisierung im Zuge des Alterungsprozesses ab. Zwischen den DIV 21 und DIV 42 primären neuronalen Zellkulturen ist eine Reduktion der Schnittpunkte mit der Schollmaske bei den DIV 42 Neuronen sichtbar (siehe Abbildung 3.1 C). Bei den DIV 84 Neuronen lagen im Vergleich zu den Neuronen der DIV 42 und 21 Gruppen deutlich weniger Dendritenverzweigungen in Proximität zum Soma vor (vgl. Abbildung 3.1 D, E). Interessanterweise wiesen die Neuronen bei DIV 84 ab einer Entfernung von ca. 100  $\mu\text{m}$  vom Soma eine stärkere Arborisierung der Dendriten in Kontrast zu den DIV 21 und DIV 42 Gruppen auf (siehe Abbildung 3.1 D, E).



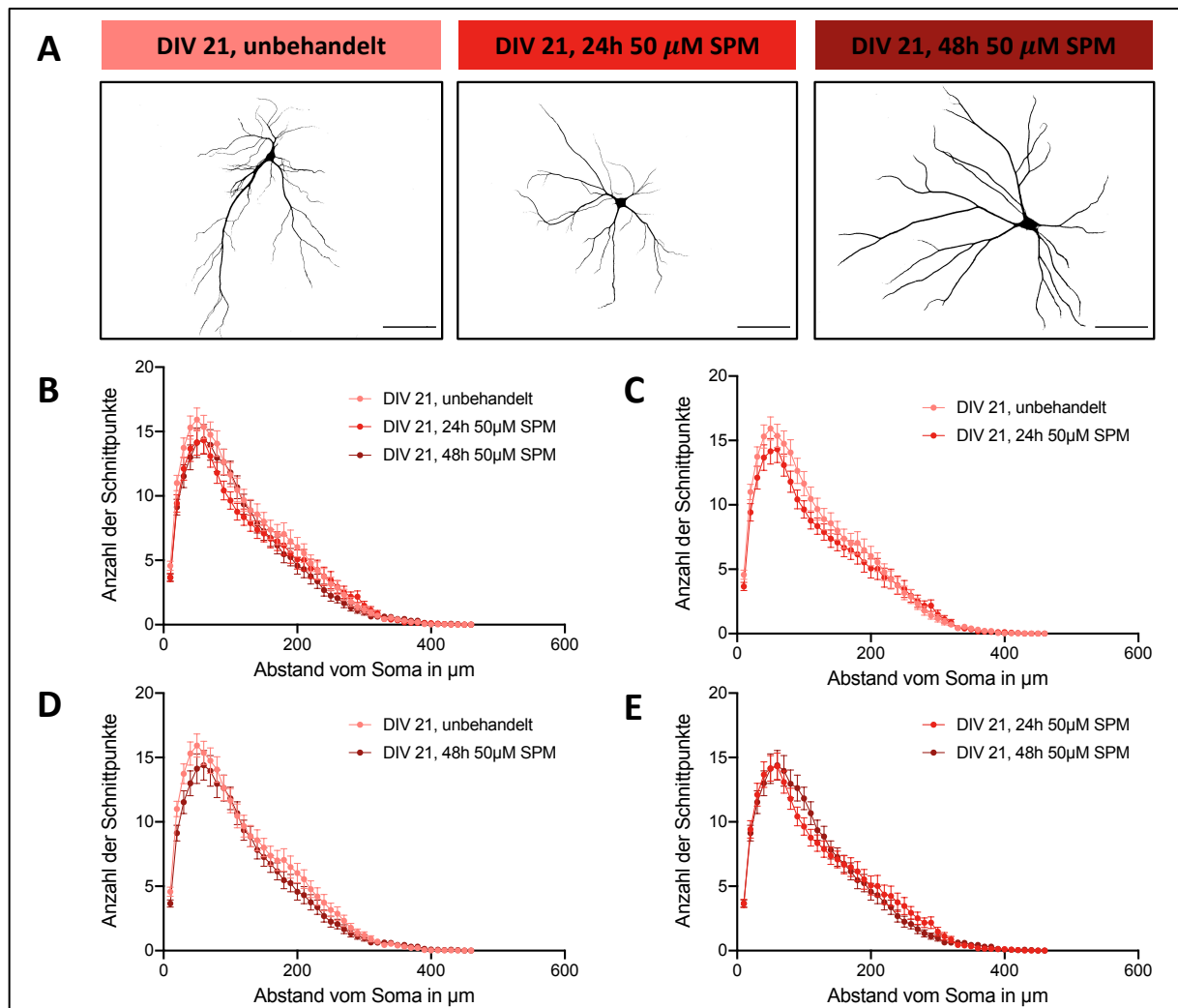
**Abbildung 3.1: Alternde Neurone *in vitro* verlieren ihre morphologische Komplexität**

Morphologie MAP 2-gefärbter Neurone kortikaler Primärkulturen zu den Zeitpunkten DIV 21, DIV 42 und DIV 84. Maßstab: 100 μm (A). Zusammenfassende quantitative Darstellung der Sholl-Analyse aller untersuchter Altersgruppen (B) und detaillierter Vergleich der Sholl-Analyse einzelner Altersgruppen untereinander (C-E). Die statistische Analyse wurde mittels Two-Way ANOVA und anschließend Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 15 analysierten Zellen).

### 3.1.2 Sholl-Analyse der Neurone unterschiedlicher Altersgruppen *in vitro* nach Spermidin-Applikation

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Sholl-Analysen von Neuronen aus kortikalen Primärkulturen der Ratte im Alter von DIV 21, DIV 42 und DIV 84 nach einer 50 μM Spermidin-Behandlung für 24 h oder 48 h dargestellt.

Wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, führte eine externe Spermidinzufuhr von 50  $\mu\text{M}$  für 24 h oder 48 h bei jungen (DIV 21) primären neuronalen Zellkulturen zu keiner signifikanten Veränderung der dendritischen Architektur.

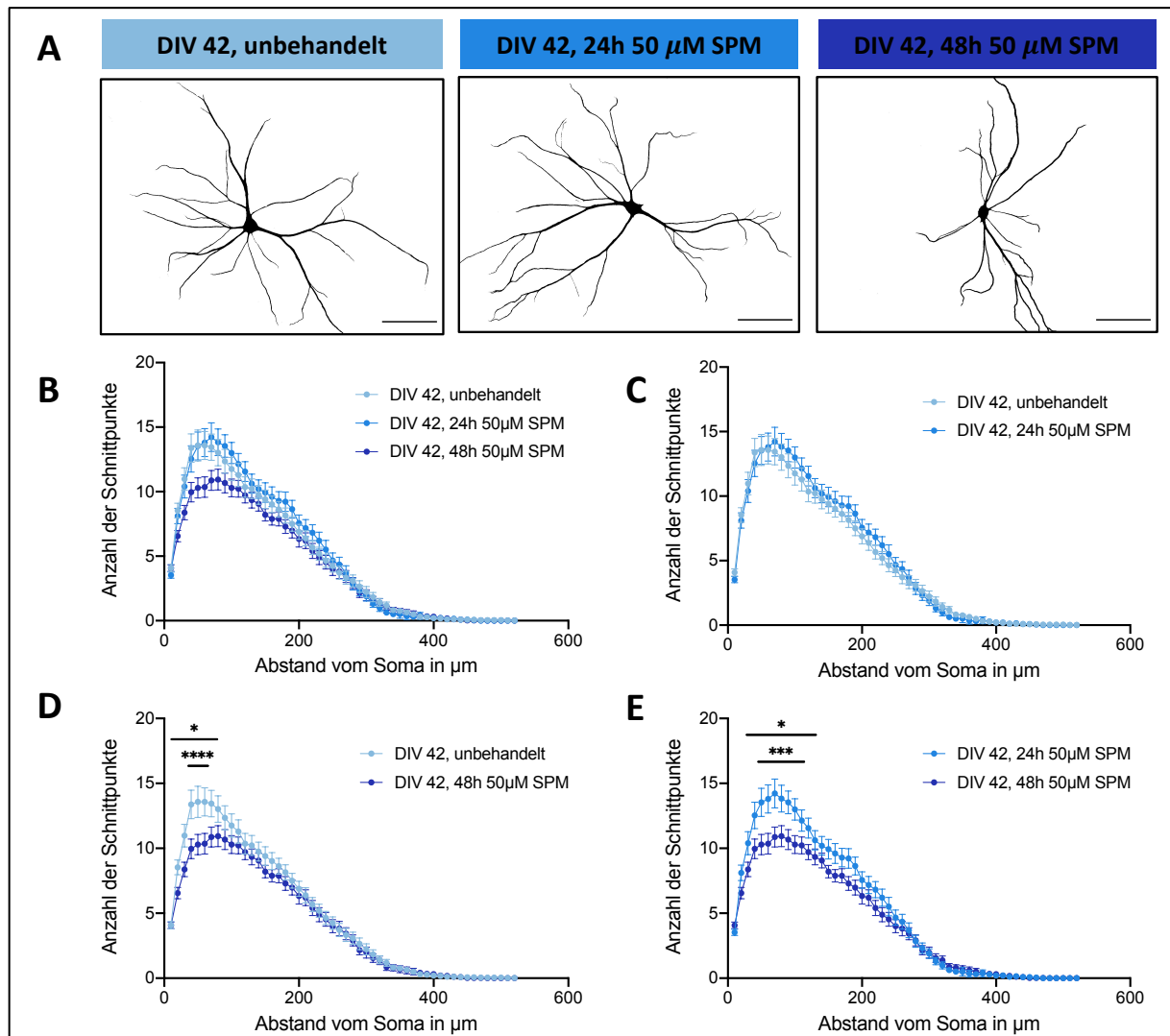


**Abbildung 3.2: Spermidin-Supplementierung führt zu keinen signifikanten Veränderungen in der Morphologie von jungen (DIV21) Primärneuronen *in vitro***

Kortikale Primärneurone der Ratte wurden zu DIV 21 für 24 h oder 48 h mit 50  $\mu\text{M}$  Spermidin (SPM) supplementiert, anschließend mit MAP 2 gefärbt und mittels Sholl-Analyse morphologisch charakterisiert. Maßstab: 100  $\mu\text{m}$  (A). Dargestellt ist eine Übersicht der Sholl-Analysen aller Konditionen (B) sowie eine Detailanalyse der einzelnen Konditionen (C-E). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels Two-Way ANOVA und anschließendem Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 15 analysierten Zellen).

Die Spermidin-Supplementierung für 24 h führte bei mittelalten (DIV 42) kortikalen Primärneuronen der Ratte ebenfalls zu keinen signifikanten Veränderungen in der Sholl-Analyse (siehe Abbildung 3.3 C). Bemerkenswert ist im Gegensatz dazu die Reduktion der dendritischen Verzweigungen nach 48 h

Spermidin-Behandlung. Insbesondere die Anzahl der Schnittpunkte mit der Sholl-Maske waren in einer Entfernung von 40-100  $\mu\text{m}$  vom Soma signifikant verringert (siehe Abbildung 3.3 D,E).

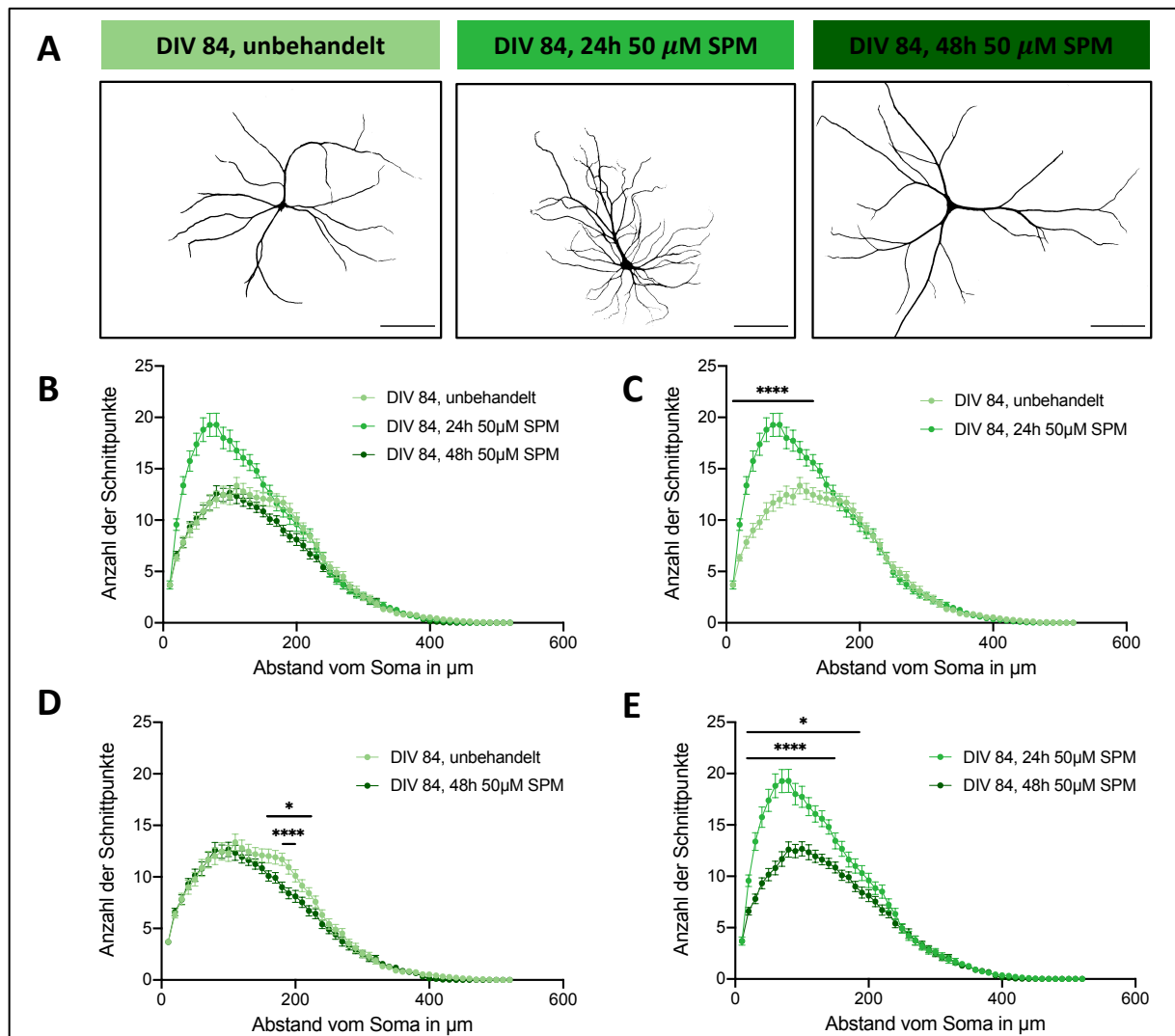


**Abbildung 3.3: Morphologische Veränderungen neuronaler Zellen nach Spermidin-Supplementierung von mittelalten (DIV42) Primärkulturen**

Darstellung MAP 2 gefärbter primärer neuronaler Rattenkulturen (DIV 42) nach Behandlung mit Spermidin (SPM) für 24 h oder 48 h. Maßstab: 100  $\mu\text{m}$  (A). Eine Gesamtübersicht der Sholl-Analysen von 42 Tage alten Neuronen ist in B dargestellt, vergleichende Einzelanalysen in C-E. Beachte: Neurone die für 48 h mit Spermidin in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  behandelt wurden, wiesen signifikant weniger Schnittpunkte mit der Sholl-Maske auf als unbehandelte oder nur für 24 h mit Spermidin behandelte Neuronen (D,E). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels Two-Way ANOVA und anschließendem Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 15 analysierten Zellen).

Eine Spermidin-Supplementierung für 24 h führte bei DIV 84 Neuronen zu einem deutlichen Anstieg an Schnittpunkten mit der Schollmaske, was auf eine höhere Anzahl dendritischer Verzweigungen

sowie ein gesteigertes dendritisches Wachstum schließen lässt (siehe Abbildung 3.4 A, C). Die Anzahl der Dendritenverzweigungen nahm insbesondere in Proximität zum Soma zu. Diese Veränderung war bei Neuronen, welche für 48 h in mit Spermidin angereichertem Medium wuchsen, nicht sichtbar, was einen temporären Effekt vermuten lässt. In Abbildung 3.4 A ist eine repräsentative Aufnahme eines für 24 h mit Spermidin behandelten Neurons dargestellt. Zu sehen sind vermehrte primäre Dendriten, d. h. Dendriten die direkt dem Soma entspringen und eine größere Anzahl dendritischer Verzweigungen [137].

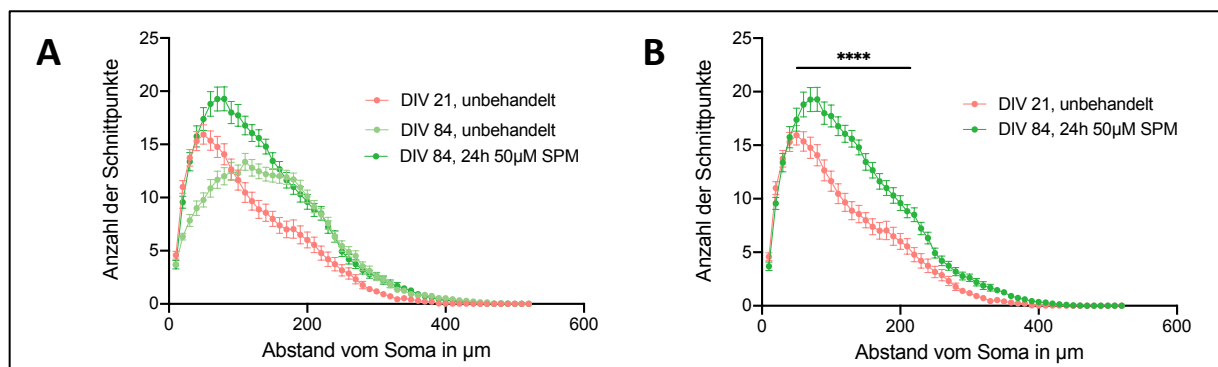


**Abbildung 3.4: Spermidin-Supplementierung für 24 h führt zu mehr dendritischen Verzweigungen bei älteren Neuronen (DIV84)**

MAP 2-Färbung älterer Primärneurone (DIV 84) 24 h und 48 h nach Spermidin-Supplementierung. Maßstab: 100 µm (A). Übersichtsdarstellung (B) und Einzellauswertungen (C-E) der Sholl-Analysen. Bemerke: 24 h Spermidin-Supplementierung führte zu einer signifikanten Steigerung der neuronalen Komplexität. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels Two-Way ANOVA und anschließend Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (\* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 15 analysierten Zellen).



Abbildung 3.5 stellt die Ergebnisse der Sholl-Analysen der jungen unbehandelten Neurone gegenüber den alten unbehandelten und alten für 24 h mit 50  $\mu$ M Spermidin behandelten Neurone gemeinsam dar. Aus Abbildung 3.5 A wird deutlich, dass eine 50  $\mu$ M Spermidin-Supplementierung für 24 h bei DIV 84 Neuronen zu einem vermehrten dendritischen Wachstum führte. Ihr Erscheinungsbild näherte sich den jungen unbehandelten Neuronen an. Wobei die Spermidinzufuhr für 24 h bei DIV 84 Neuronen sogar zu mehr Intersektionen in Somanähe (bis 220  $\mu$ m) führte, als die jungen unbehandelten Neuronen aufwiesen (siehe Abbildung 3.5 B). Die Verabreichung von Spermidin für 24 h stellte die dendritische Architektur der gealterten Kulturen wieder auf die in jungen Kulturen beobachtete, komplexere Morphologie zurück.

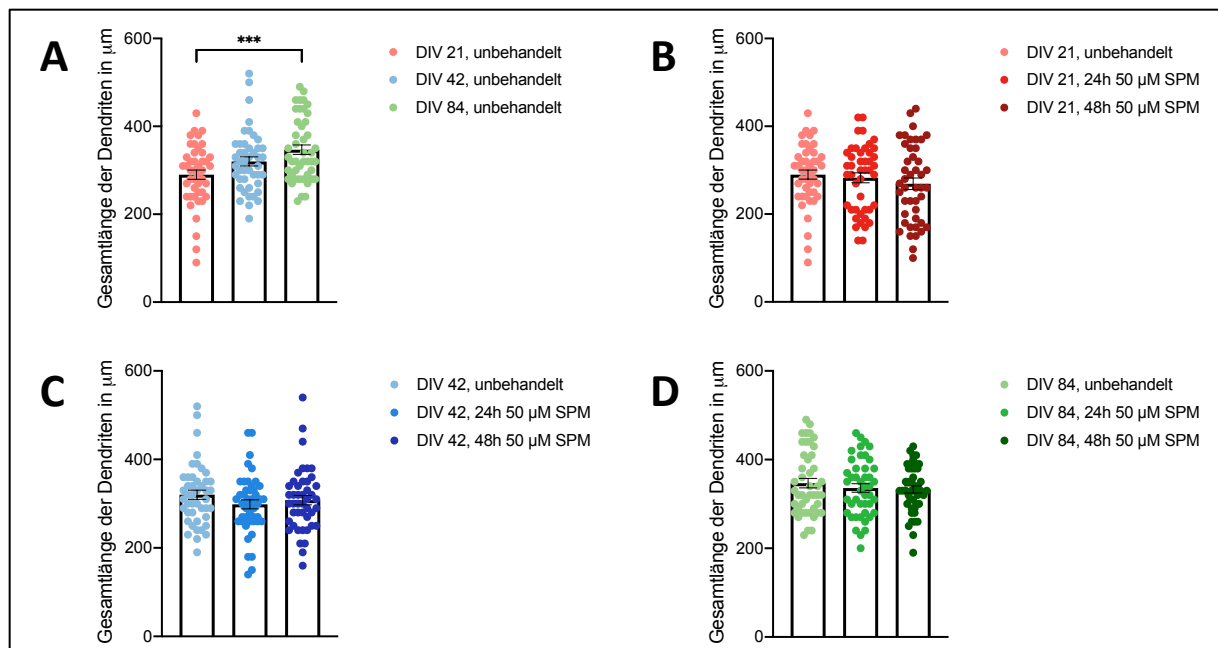


**Abbildung 3.5: Rejuvenationseffekt bei gealterten Primärneuronen *in vitro*, 24 h nach Spermidin-Supplementierung**

Gemeinsame Darstellung der Morphologie MAP 2-gefärbter Neurone unbehandelter kortikaler Primärkulturen zu den Zeitpunkten DIV 21 und DIV 84 zusammen mit den DIV 84 Neuronen nach 24 h Spermidin-Supplementierung (A). Für 24 h mit 50  $\mu$ M Spermidin behandelte alte Neuronen (DIV 84) wiesen einen Anstieg der dendritischen Intersektion auf, der die Werte der jungen Neuronen übertraf. Die statistische Analyse wurde mittels Two-Way ANOVA und anschließendem Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt ( $***P < 0.001$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 15 analysierten Zellen).

### 3.1.3 Analyse der Dendritenlänge Spermidin-behandelter Neurone unterschiedlicher Altersgruppen *in vitro*

Anschließend wurde die maximale Länge der Dendriten bestimmt. Hier zeigte sich ein Unterschied zwischen den Altersgruppen. Die Dendriten der DIV 84 Neurone waren signifikant länger als die Dendriten der jüngeren (DIV 21) Neurone. Auch die Dendriten der mittelalten Neuronen (DIV 42) waren tendenziell länger als die der DIV 21 Neuronen (DIV 21, unbehandelt vs. DIV 42, unbehandelt  $p = 0,0515$ ; siehe Abbildung 3.6 A). Ein 50  $\mu$ M Spermidin-Anreicherung des Mediums für 24 h oder 48 h führte in keiner der Altersgruppen (DIV 21, DIV 42, DIV 84) zu einer Veränderung der maximalen Dendritenlänge (siehe Abbildung 3.6 B-C).



**Abbildung 3.6: Die Dendritenlänge von Primärneuronen *in vitro* nimmt altersabhängig zu und wird durch Applikation von Spermidin nicht beeinflusst**

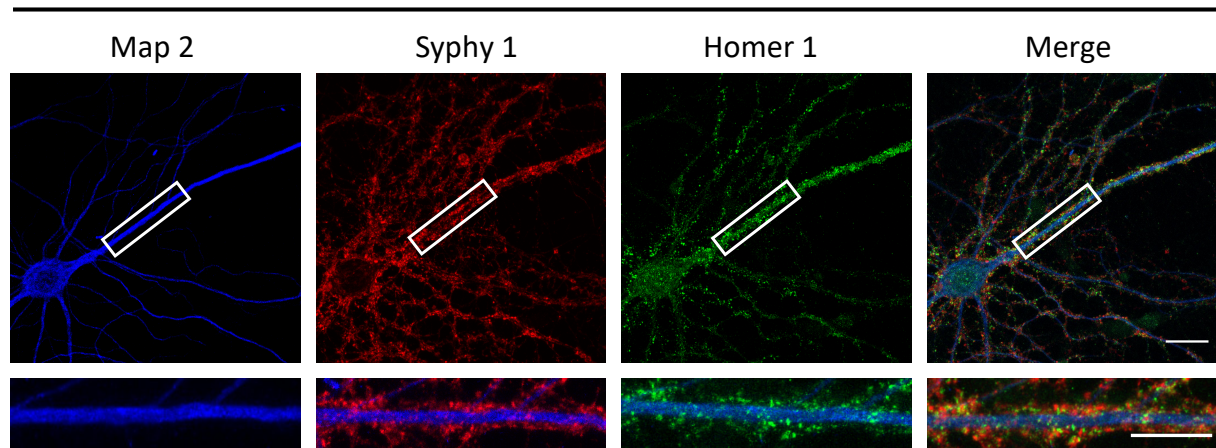
Unbehandelte und für 24 h oder 48 h mit 50  $\mu\text{M}$  Spermidin behandelte Neurone unterschiedlichen Alters (DIV 21, 42, 84) von kortikalen Primärkulturen der Ratte wurden mit MAP 2 gefärbt und die durchschnittliche Dendritenlänge bestimmt (A). Spermidin-Behandlung für 24 h oder 48 h führte zu keiner signifikanten Veränderung der Dendritenlänge in allen drei Altersgruppen (B, C, D). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels One-Way ANOVA und anschließendem Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt ( $***P < 0.001$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 15 analysierten Zellen).

### 3.1.4 Analyse prä- und postsynaptischer Proteinmarker alternder Neurone *in vitro*

Der Alterungsprozess führt auch zu multiplen Veränderungen der synaptischen Architektur, wie bereits ausführlich in Kapitel 1.5.1.1 beschrieben wurde. Aus vorherigen Arbeiten ging hervor, dass Spermidin vor synaptischer Alterung schützt [138]. Ziel dieser Arbeit war es, strukturelle Veränderungen der Prä- und Postsynapsen in Hinsicht auf Anzahl, Größe und Intensität der Fluoreszenzsignale zu quantifizieren. Die Co-Lokalisation eines prä- und eines postsynaptischen Signals wurde hierbei als funktionelle Synapse gewertet. Zur Identifizierung der Präsynapse wurde Synaptophysin 1 (Syphy 1) verwendet. Es ist ein integrales Membranprotein der synaptischen Vesikel und gilt als spezifischer und empfindlicher Marker für präsynaptische Endigungen [139, 140]. Die Postsynapse wurde durch einen primären Antikörper gegen Homer 1 detektiert. Homer 1 ist in postsynaptischen Strukturen exzitatorischer Neurone konzentriert [141, 142].

In Abbildung 3.7 ist eine Aufnahme eines mit MAP 2 (blau), Syphy 1 (rot) und Homer 1 (grün) co-immungefärbten Neurons nach Behandlung mit Spermidin für 24 h dargestellt. Ein Abschnitt des primären Dendriten wurde für die Analyse der synaptischen Struktur ausgewählt.

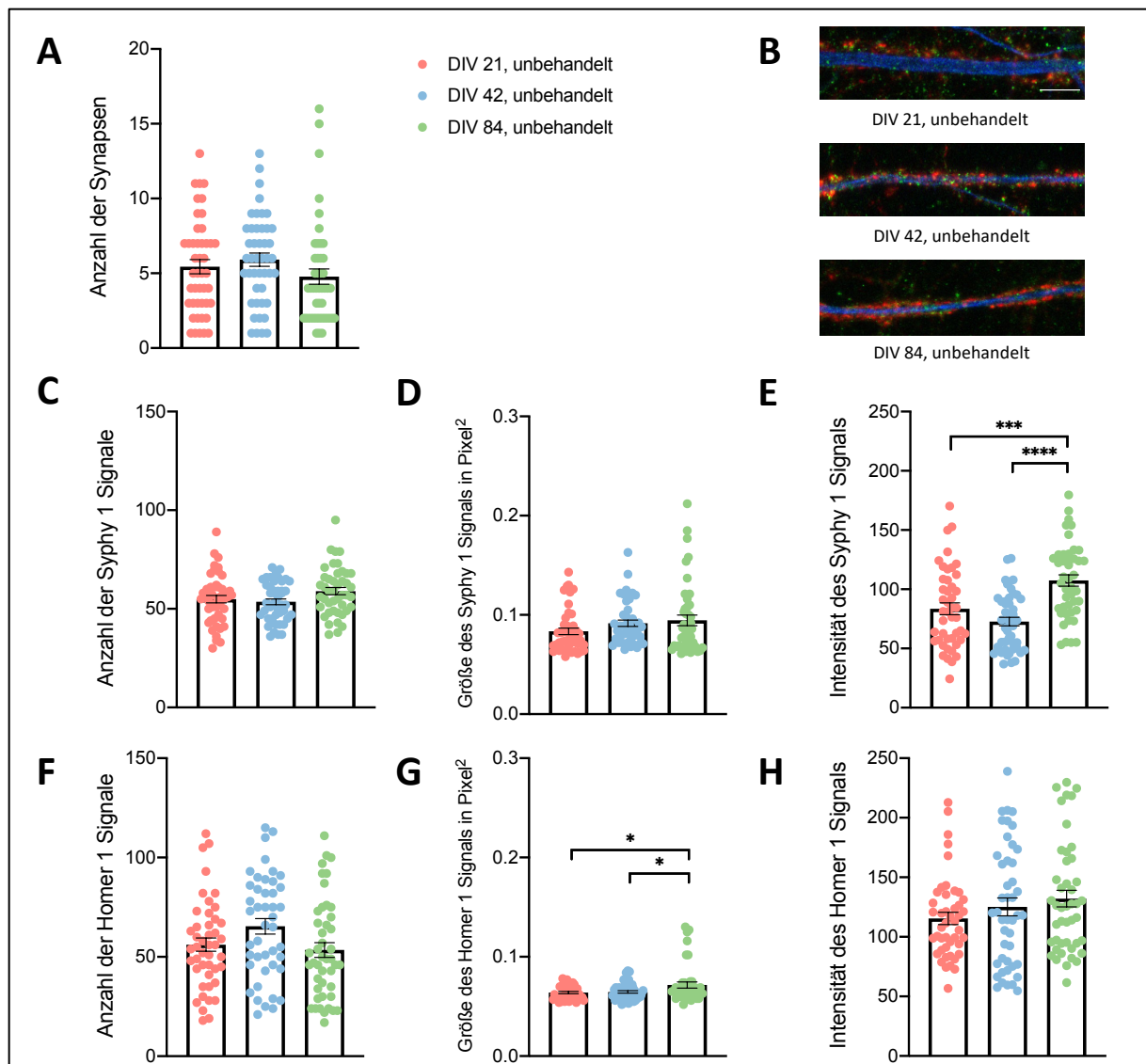
### DIV 84, 24h SPM



**Abbildung 3.7: Exemplarische Darstellung eines DIV 84 alten, für 24 h mit Spermidin behandelten Neurons**

Aufnahme eines mit MAP 2 (blau), Syphy 1 (rot) und Homer 1 (grün) gefärbten Neurons (DIV 84) einer primären neuronalen Zellkultur der Ratte, welches für 24 h mit 50  $\mu$ M Spermidin behandelt wurde. Aus den Bildern wurde ein Abschnitt des primären Dendriten vergrößert. Die einzelnen Färbungen zur Darstellung der Prä- und Postsynapse wurden mit der MAP 2 Färbung kombiniert. Maßstab: 20  $\mu$ m.

In Abbildung 3.8 sind die Signale der synaptischen Marker Syphy 1 und Homer 1 primärer Dendriten kortikaler Primärkulturen der Ratte unterschiedlichen Alters (DIV 21, 42, 84) dargestellt. Es wurden die Anzahl, Größe und die Intensität der Signale gemessen. Eine funktionelle Synapse bestand bei einer Co-Lokalisation beider Marker [143, 144]. In gealterten Zellen (DIV 84) nahm die Intensität des präsynaptischen Markers Syphy 1 deutlich zu (vgl. Abbildung 3.8 E). Darüber hinaus waren die Anzahl der Syphy 1 Signale in den alten Neuronen tendenziell erhöht (DIV 42 unbehandelt vs. DIV 84 unbehandelt  $p=0,0781$ ; siehe Abbildung 3.8 C). Gleichzeitig nahm auch die Größe des Homer 1 Signals bei den alten Zellen (DIV 84) im Vergleich zu den beiden jüngeren Gruppen zu (siehe Abbildung 3.8 G).



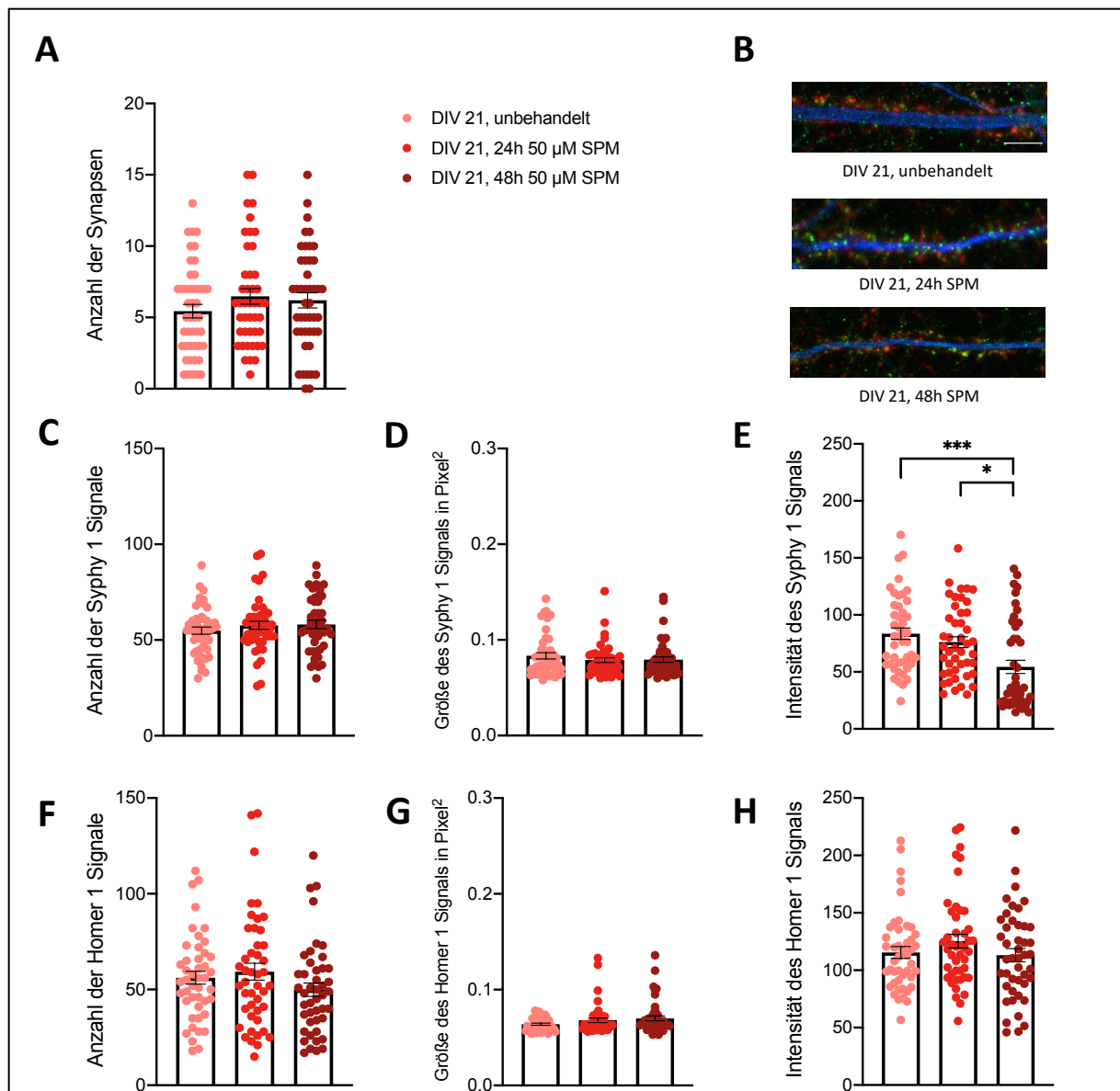
### Abbildung 3.8: Altersabhängige Veränderung der synaptischen Morphologie in kortikalen Primärneuronen

Primäre neuronale Zellkulturen der Ratte zu den Zeitpunkten DIV 21, 42, 84 wurden mit Syphy 1 (rot) als präsynaptischen Marker und Homer 1 (grün) als postsynaptischer Marker gefärbt. Repräsentative Aufnahmen neuronaler primärer Dendriten (MAP 2; blau), Maßstab: 20 µm (B). Quantifiziert wurden die Anzahl, Größe und Intensität der Signale (A, C-H). Eine Co-Lokalisation von Syphy 1 und Homer 1 Signalen wurde als funktionelle Synapse gewertet (A). Bemerke: die Intensität des Syphy 1 Signals und die Größe des Homer 1 Signals war bei den 84 Tage alten Neuronen im Vergleich zu Neuronen bei DIV 21 und DIV 40 signifikant erhöht (E, G). Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels One-Way ANOVA und anschließendem Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 15 analysierten Zellen).

### 3.1.5 Analyse prä- und postsynaptischer Signale Spermidin-behandelter Neurone unterschiedlicher Altersstufen *in vitro*

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Quantifizierung der Prä- und Postsynapsen von Neuronen aus kortikalen Primärkulturen der Ratte unterschiedlichen Alters nach einer 50  $\mu$ M Spermidin-Behandlung für 24 h oder 48 h dargestellt. Wie im vorherigen Abschnitt wurden die Zeitpunkte DIV 21, 42 und 84 für den Behandlungsbeginn gewählt. Sie repräsentieren junge erwachsene, ältere erwachsene und sehr alte Neurone.

Bei den am Zeitpunkt DIV 21 fixierten Neuronen führte eine Spermidin-Supplementierung zu keinen signifikanten Veränderungen. Einzig in der Intensität des Syphy 1 Signals fand sich eine signifikante Reduktion bei der für 48 h behandelten Gruppe (siehe Abbildung 3.9 E). Da die Intensität der Signale stark vom Färbeprozess abhängt, ist es hier interessant dezidiert die einzelnen Replikate zu analysieren. So zeigten die Zellen zweier biologischer Replikate eine deutliche Reduktion der Intensität, während die Neurone eines biologischen Replikates keine Minderungen der Intensität aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Hier wäre zur besseren Beurteilung der Veränderung eine Erhöhung der biologischen Replikate sinnvoll. Dies konnte aus Zeitgründen innerhalb dieser Dissertation nicht realisiert werden. Im Fall des Homer 1 Signals ist eine Tendenz zu einer Größenzunahme bei den für 48 h behandelten Zellen sichtbar (DIV 21, unbehandelt vs. DIV 21, 48 h 50  $\mu$ M SPM  $p = 0,1085$ ; siehe Abbildung 3.9 G).

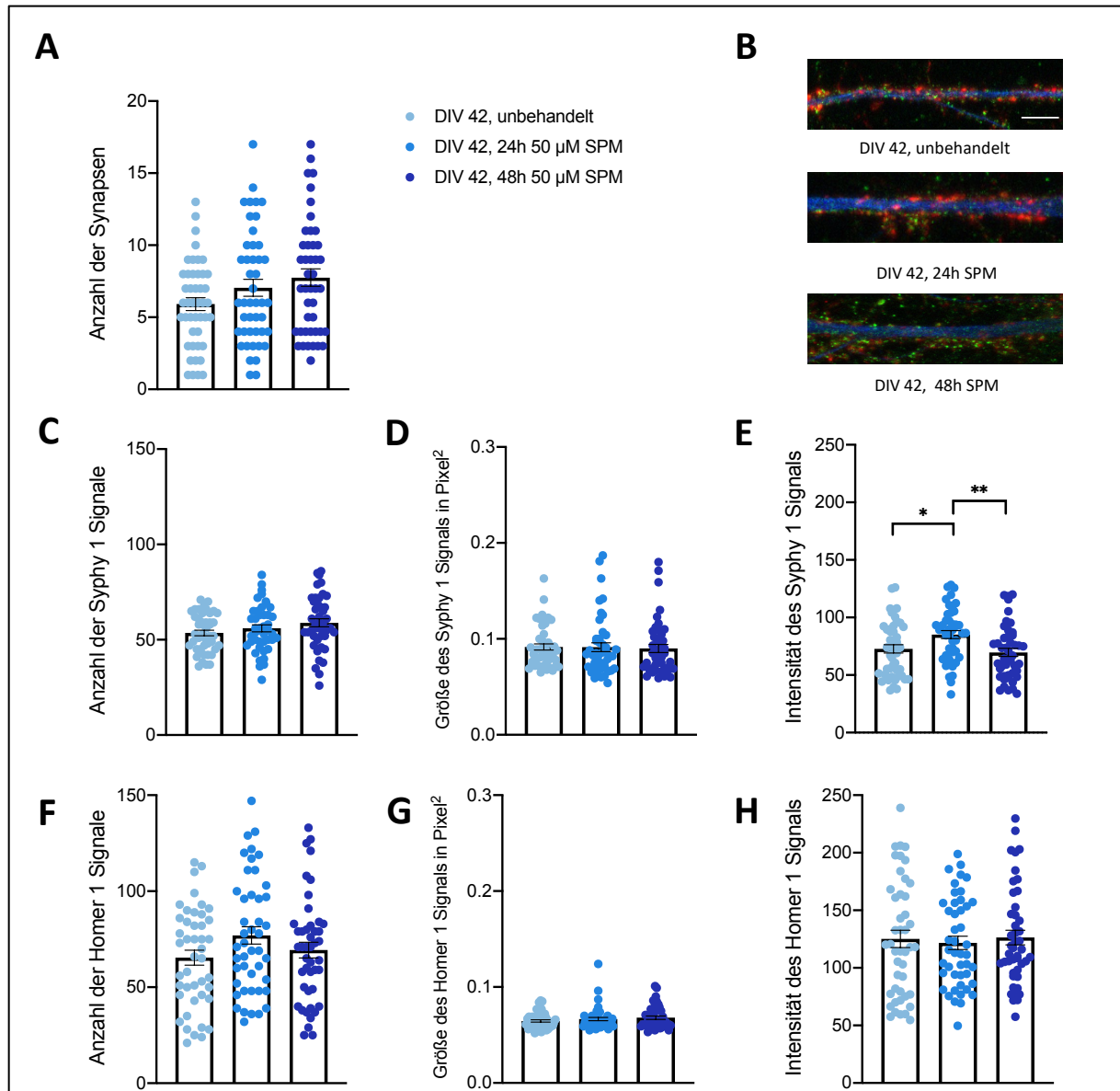


### Abbildung 3.9: Die Intensität des Syphy 1 Signals ist bei jungen Primärneuronen (DIV 21) durch Spermidin-Supplementierung vermindert

Primäre kortikale Zellkulturen (DIV 21) wurden mit 50  $\mu$ M Spermidin für 24 h und 48 h behandelt. Nach der Immunfluoreszenzfärbung mit Syphy 1 (rot) als präsynaptischer Marker und Homer 1 (grün) zur Anfärbung der Postsynapse wurden die Anzahl, Größe und Intensität der Signale ermittelt (C-H) und die Anzahl der aktiven Synapsen bestimmt (A). Exemplarische Abbildung der primären Dendriten (MAP 2; blau) im Maßstab: 20  $\mu$ m (B). Die Intensität des Syphy 1 Signals nahm nach 48 h Spermidin-Behandlung signifikant ab (E). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels One-Way ANOVA und anschließend Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 15 analysierten Zellen).

Die Spermidin-Behandlung führte bei mittelalten Neuronen (DIV 42) zu Modifikationen der synaptischen Struktur. Auch hier wurden Veränderungen des Syphy 1 Signals gemessen. So war die Intensität der für 24 h behandelten primären kortikalen Zellkulturen signifikant höher als bei den

beiden anderen Gruppen (siehe Abbildung 3.10 E). Die Spermidin-Applikation führte nicht zu Veränderungen des Homer 1 Signals. Des weiteren wiesen die für 48 h mit Spermidin behandelten Neuronen tendenziell signifikant mehr Synapsen auf (DIV 42, unbehandelt vs. DIV 42, 48 h 50  $\mu$ M SPM  $p=0,0513$ ; siehe Abbildung 3.10 A).

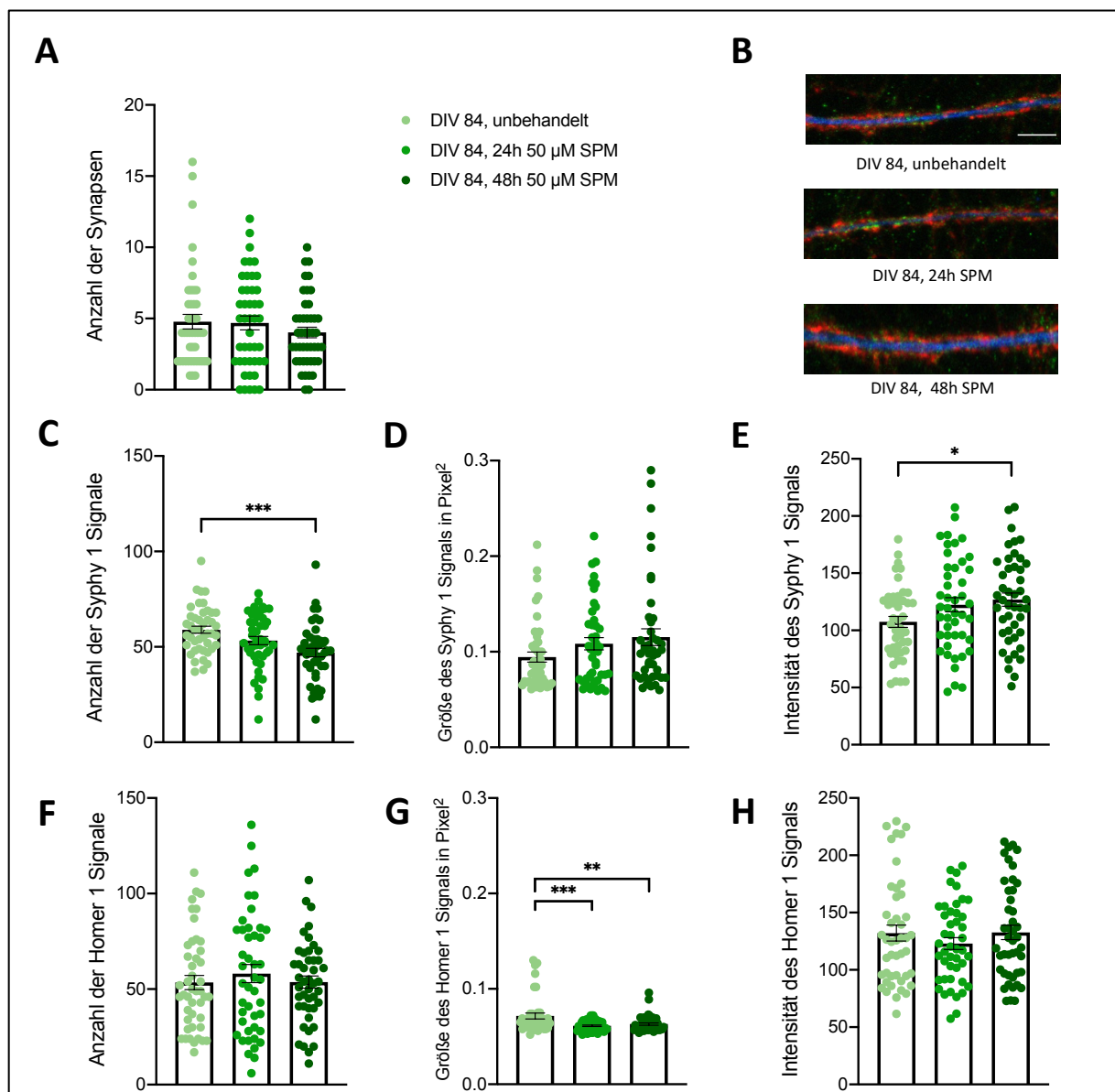


**Abbildung 3.10: Spermidin-Supplementierung führt bei 42 Tage alten Neuronen kortikaler Primärkulturen zu Veränderungen des Syphy 1 Signals**

Kortikale Primärkulturen im Alter von DIV 42 wurden mit Spermidin in der Konzentration 50  $\mu$ M für 24 h und 48 h behandelt. Nach Immunfluoreszenzfärbung mit Syphy 1 (rot) und Homer 1 (grün) wurden die Anzahl, Größe und Intensität der Signale gemessen (C-H) und die Anzahl aktiver Synapsen bestimmt (A). Repräsentative Darstellung der immungefärbten (MAP 2; blau) primären Dendriten, Maßstab: 20  $\mu$ m (B). Die Intensität des Syphy 1 Signals stieg nach 24-stündiger Spermidin-Behandlung an, während in der Gruppe, welche für 48 h behandelt wurde, keine signifikanten Veränderungen messbar waren (E). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels One-Way ANOVA und anschließendem Tukey-Post-Hoc-

Mehrfachvergleichstest durchgeführt (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 15 analysierten Zellen).

In der Gruppe der sehr alten Neurone (DIV 84) waren multiple Alterationen durch die Spermidin-Supplementierung sichtbar. Die Anzahl der Syphy 1 Signale war in der für 48 h behandelten Gruppe signifikant reduziert, während gleichzeitig die Intensität der Signale in dieser Gruppe anstieg (siehe Abbildung 3.11 C, E). Zudem ist eine Tendenz zu größeren Syphy 1 Signalen in der 48 h SPM Gruppe sichtbar (DIV 84, unbehandelt vs. DIV 84, 48 h SPM  $p = 0,0896$ ; siehe Abbildung 3.11 D). Es zeigte sich eine signifikante Größenabnahme des Homer 1 Signals infolge der Applikation von Spermidin (siehe Abbildung 3.11 G).

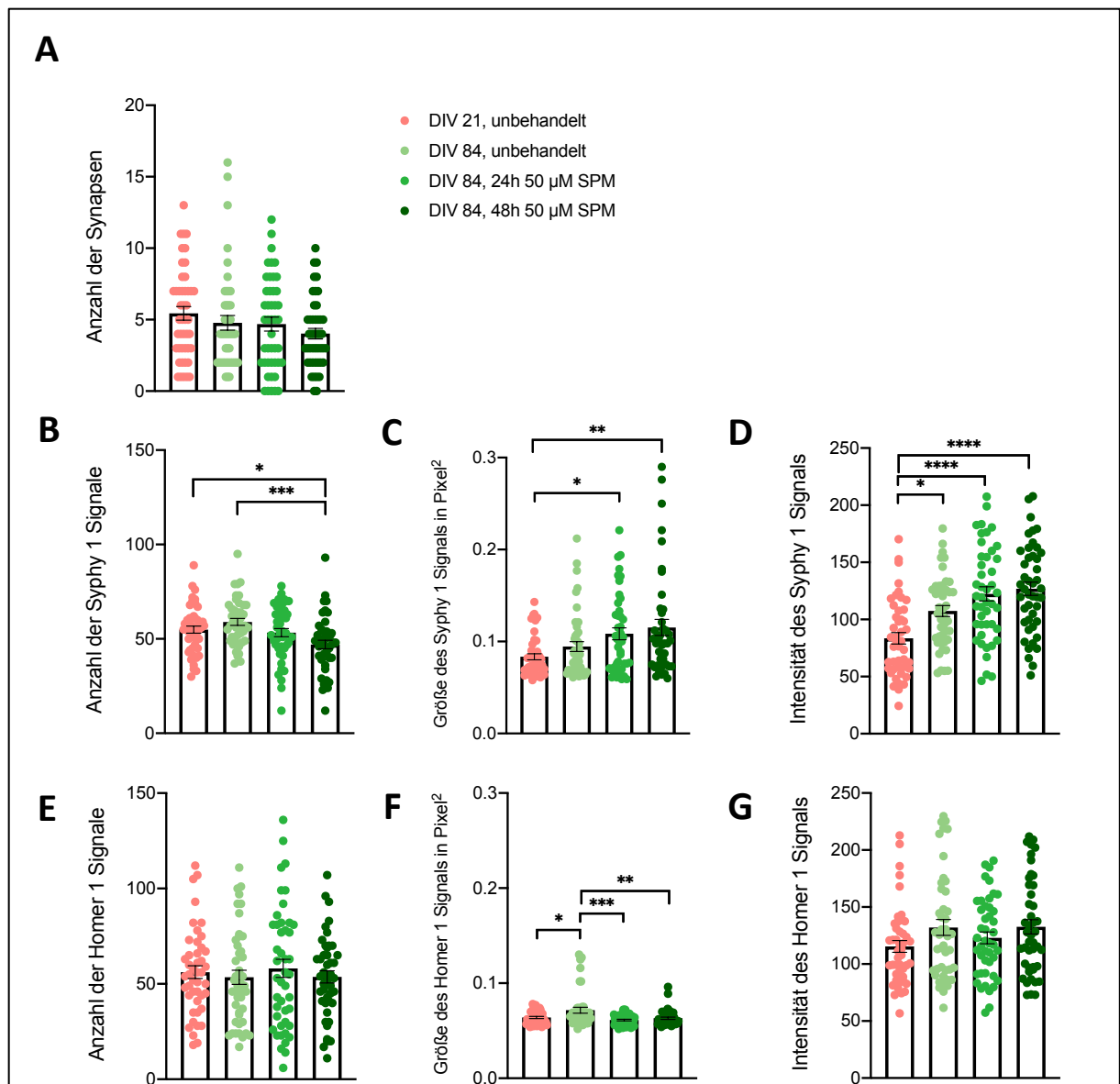


**Abbildung 3.11: Spermidin-Supplementierung gealterter neuronaler Primärkulturen (DIV84) führt zu Veränderungen der Syphy 1 und Homer 1 Signale**



Alternde primäre neuronale Zellkulturen der Ratte (DIV 84) wurden mit 50  $\mu$ M Spermidin für 24 h und 48 h behandelt. Nach Immunfluoreszenzfärbung wurden die Anzahl, Größe und Intensität der Syphy 1 (rot) und Homer 1 (grün) Signale gemessen (C-H) sowie die Anzahl aktiver Synapsen bestimmt (A). Abbildung der primären Dendriten (MAP 2; blau), Maßstab: 20  $\mu$ m (B). Bemerke: eine 48 h Spermidin-Supplementierung führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der Syphy 1 Signale bei einem gleichzeitigen Anstieg der Intensität (C,E). Die Größe des Homer 1 Signals verminderte sich signifikant nach 24 h und 48 h Spermidin-Behandlung (G). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels One-Way ANOVA und anschließendem Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 15 analysierten Zellen).

In Abbildung 3.12 werden vergleichend die unbehandelten jungen Neurone (DIV 21) gemeinsam mit den alten (DIV 84) Spermidin-behandelten Neuronen dargestellt. Hier sind verschiedene strukturelle Unterschiede sichtbar. Insbesondere das Syphy 1 Signal zeigt diverse Modifizierungen. Die Anzahl der Syphy 1 Signale ist in den primären Dendriten der für 48 h mit Spermidin behandelten alten Neurone (DIV 84) gegenüber den unbehandelten jungen (DIV 21) und alten (DIV 84) Neuronen verringert, während bei der Größe und Intensität des Signals sowohl der Alterungsprozess als auch die zusätzliche Spermidin-Applikation zu einer signifikanten Steigerung führten (siehe Abbildung 3.12 B, C, D). Hier ist ein Trend erkennbar, der durch die Spermidinzufuhr möglicherweise verstärkt wurde. Eine bemerkenswerte Beobachtung stellt die im Verlauf des Alterungsprozesses auftretende Vergrößerung des Homer 1 Signals dar, welche jedoch durch Spermidin-Applikation signifikant abgeschwächt wurde (siehe Abbildung 3.12 F).



**Abbildung 3.12: Veränderte Synapsenstruktur bei alten (DIV 84), Spermidin-behandelten Neuronen im Vergleich zu jungen (DIV 21) unbehandelten Neuronen**

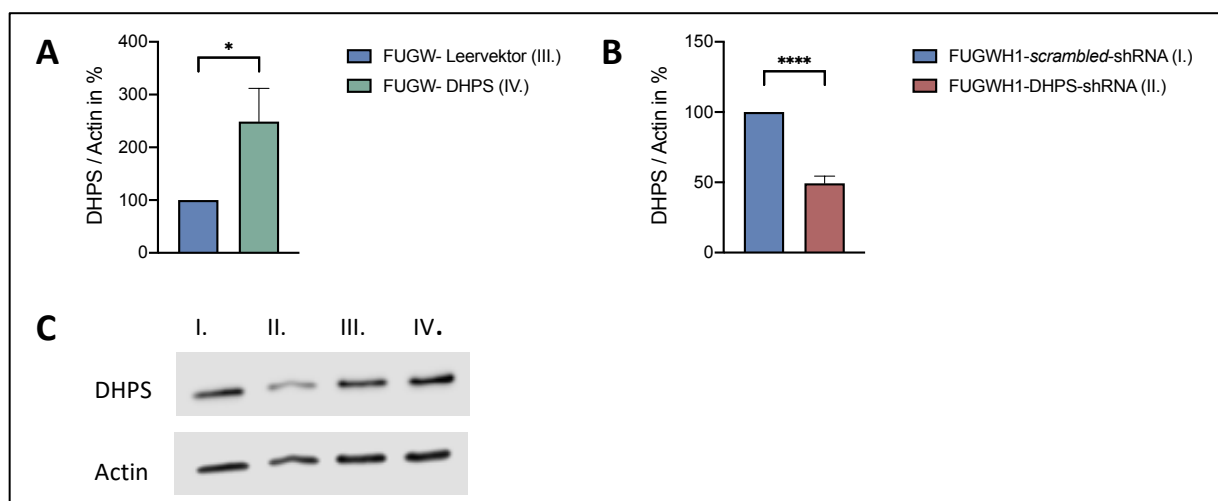
Vergleichende Darstellung junger un behandelter und alternder mit Spermidin behandelter Neurone. Primäre neuronale Zellkulturen der Ratte (DIV 84) wurden für 24 h und 48 h mit 50  $\mu$ M Spermidin behandelt. Nach Immunfluoreszenzfärbung wurden die Anzahl, Größe und Intensität der Syphy 1 und Homer 1 Signale ermittelt (C-H). Es zeigten sich multiple Veränderungen zwischen den jungen Neuronen (DIV 21) und den mit Spermidin behandelten alten Neuronen. Interessanterweise ist bei der Größe und Intensität des Syphy 1 Signals ein Trend erkennbar, der durch Spermidin-Applikation verstärkt wird. Die un behandelten alten Neurone (DIV 84) wiesen ein größeres Homer 1 Signal auf, welches bei den behandelten Neuronen nicht vorhanden war. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels One-Way ANOVA und anschließendem Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 15 analysierten Zellen).

## 3.2 Morphologische Analyse kortikaler Primärneurone *in vitro* nach lentiviraler Überexpression oder *knock-down* der DHPS

Im folgenden Abschnitt werden die Analysen der neuronalen Konzentrationsveränderung der DHPS dargestellt. Diese Modifikation erfolgte über lentivirale Transduktion eines Überexpressions- und eines *knock-down*-Konstruktes für dieses Enzym. Zum Ausschluss von Ergebnisverzerrungen durch die Infektion oder die Plasmide wurde für beide Konstrukte ein Kontrollvektor erstellt. Im Fall des Überexpressionskonstrukts war dies der FUGW-Leervektor und für das *knock-down*-Konstrukt eine „*scrambled*“ shRNA, ein RNA-Fragment, welches aus Basenpaaren besteht, die nicht komplementär zu bekannten DNA- oder RNA-Sequenzen sind, aber die identischen Basen wie das *knock-down*-Konstrukt enthält. Zu Beginn wurde die Effektivität der Konstrukte getestet.

### 3.2.1 Effektivitätsprüfung der Überexpressions- und *knock-down*-Konstrukte

Vor der Verpackung der Plasmide in Lentiviren wurde ihre Effektivität in HEK293T-Zellen getestet. Eine Vorauswahl der Plasmide erfolgte durch cand. med. Alwin Hassler. Aus dieser Vorselektion wurden die effektivsten Klone ausgewählt. Im Anhang sind die Western-Blot Ergebnisse des später verwendeten *knock-down*-Konstruktes dargestellt (siehe Kapitel 10.1). Anschließend wurde die Effektivität der Konstrukte in primären kortikalen Zellkulturen getestet. Neurone, welche das Überexpressionskonstrukt enthielten, wiesen eine signifikante Erhöhung der DHPS-Konzentration auf, während der *knock-down* desselben eine deutliche Reduktion der Konzentration zur Folge hatte (siehe Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13: DHPS-Konzentration nach lentiviraler Transduktion der verwendeten Konstrukte**

Die Plasmide FUGW-DHPS, FUGWH1-*scrambled*-shRNA und FUGWH1-DHPS-shRNA wurden durch lentivirale Transduktion in die Neuronen eingebracht und die DHPS-Konzentrationen in den Kontrollgruppen (FUGW-DHPS + FUGWH1-*scrambled*-shRNA) auf 100 normalisiert. Die Überexpression des Enzyms durch das FUGW-DHPS-Konstrukt resultierte in einer signifikanten Erhöhung der DHPS-Konzentration (A,C), während sie durch das

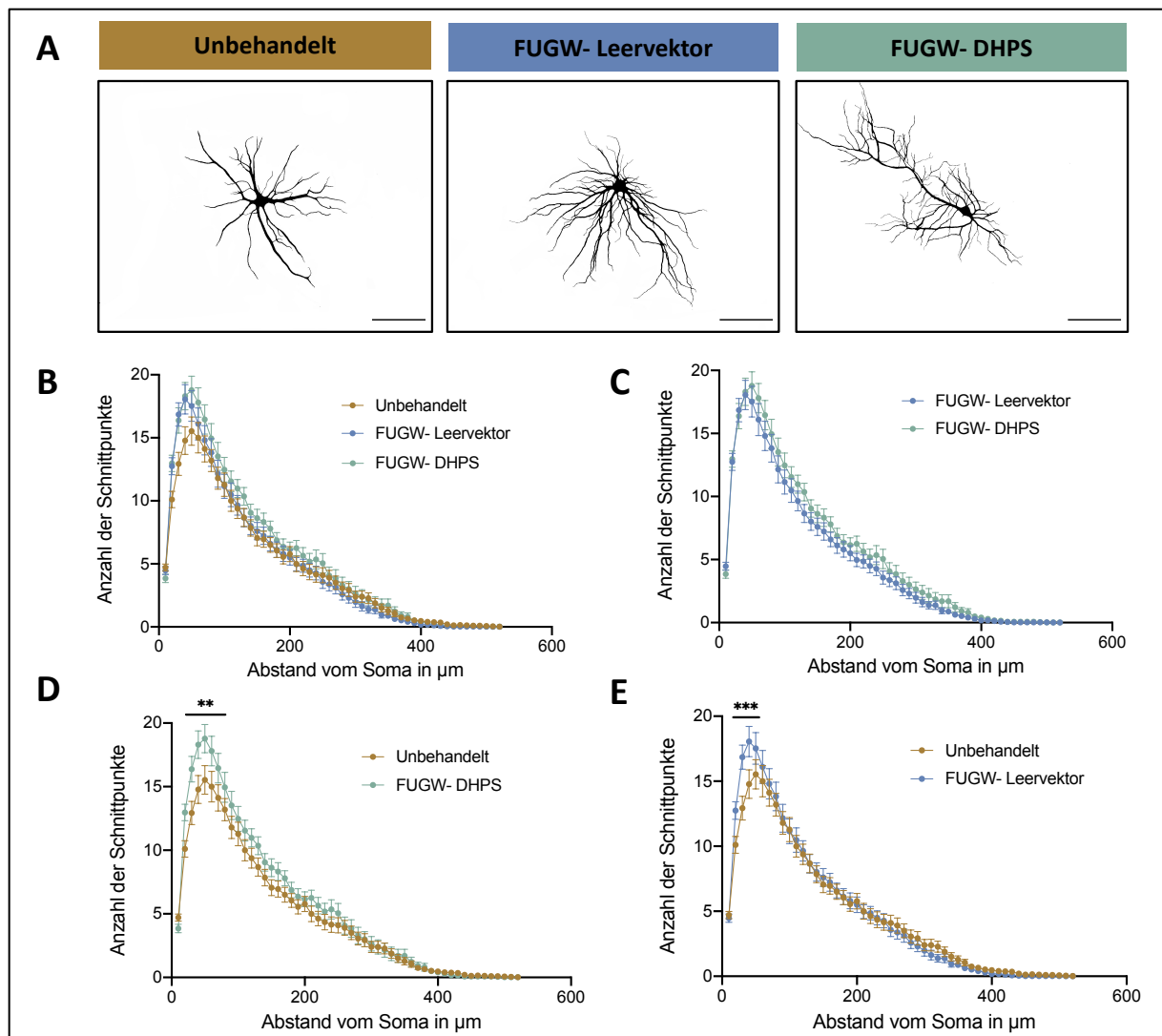
*knock-down*-Konstrukt (FUGWH1-DHPS-shRNA) reduziert wurde (B,C). Für die statistische Analyse wurde ein ungepaarter t-Test nach Student verwendet (Es wurden drei biologische Replikate mit jeweils 3 technischen Replikaten durchgeführt).

### 3.2.2 Sholl-Analyse kortikaler Primärneurone nach *knock-down* und Überexpression der DHPS

Primäre neuronale Zellkulturen wurden an DIV 3 mit Lentiviren, welche jeweils das FUGW-DHPS- oder das FUGWH1-DHPS-shRNA-Konstrukt bzw. als Kontrollen das FUGW-Leervektor- oder FUGWH1-*scrambled*-shRNA Plasmid enthielten, infiziert. Die Zellen wurden an DIV 21 fixiert und mit Antikörpern gegen MAP 2 immungefärbt. Bilder der infizierten - GFP-positiven Neurone - wurden mittels Sholl-Analyse quantifiziert.

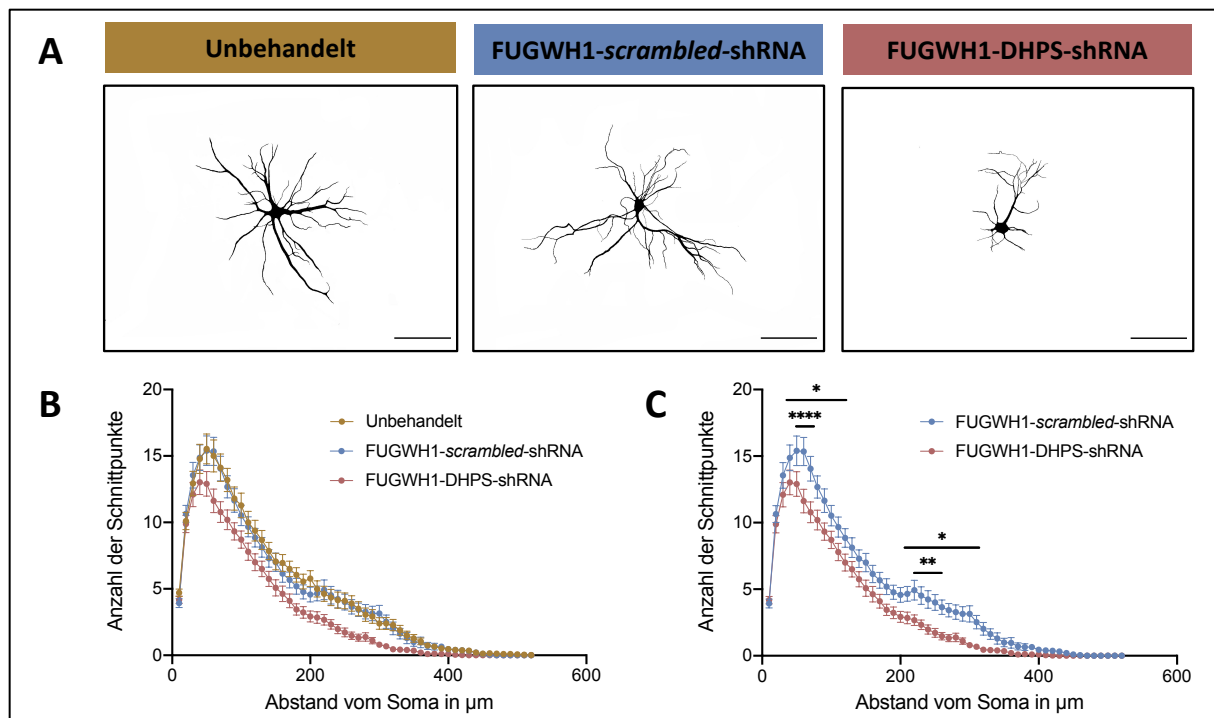
Es zeigte sich, dass eine DHPS Überexpression im Vergleich zur FUGW-Leervektor-Kontrollgruppe zu keiner Veränderung der dendritischen Struktur führte (siehe Abbildung 3.14 C). Im Vergleich zu unbehandelten Neuronen wiesen sowohl die Neurone der FUGW-Leervektor-Kontrollgruppe als auch diejenigen, die das Überexpressionskonstrukt enthielten, eine erhöhte Anzahl an Schnittpunkten mit der Sholl-Maske in der Nähe des Somas auf (siehe Abbildung 3.14 A, D, E). Daher ist anzunehmen, dass allein die Infektion oder das Einbringen des FUGW-Vektors eine verstärkte Arborisierung der Dendriten hervorgerufen hat.

Die Konzentrationsverminderung der DHPS mittels *knock-down* führte zu einer geringeren Komplexität der Dendriten in proximalen und distalen Bereichen des Neurons. Dieser Effekt war sowohl im Vergleich zu der FUGWH1-*scrambled*-shRNA-Kontrollgruppe, als auch zu den unbehandelten Neuronen sichtbar (siehe Abbildung 3.15 A, B, C).



**Abbildung 3.14: Mit FUGW-Leervektor und FUGW-DHPS infizierte Neurone zeigen eine stärkere Verzweigung der Dendriten**

Primäre neuronale Zellkulturen der Ratte wurden an DIV 3 mit Lentiviren, welche das FUGW-Leervektor- oder FUGW-DHPS-Plasmid enthielten, infiziert. An DIV 21 wurden die Kulturen fixiert, MAP 2 gefärbt und eine Sholl-Analyse durchgeführt. Maßstab: 100 µm (A). Bei der Quantifizierung der Sholl-Analysen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit dem FUGW-Leervektor infizierten Neuronen und denen, welche das FUGW-DHPS Plasmid enthielten (C). Sowohl die mit FUGW-DHPS als auch die mit dem Leervektor infizierten Neuronen wiesen eine stärkere Arborisierung der Dendriten gegenüber den unbehandelten Neuronen auf (D, E). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels Two-Way ANOVA und anschließendem Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 10-15 analysierten Zellen).

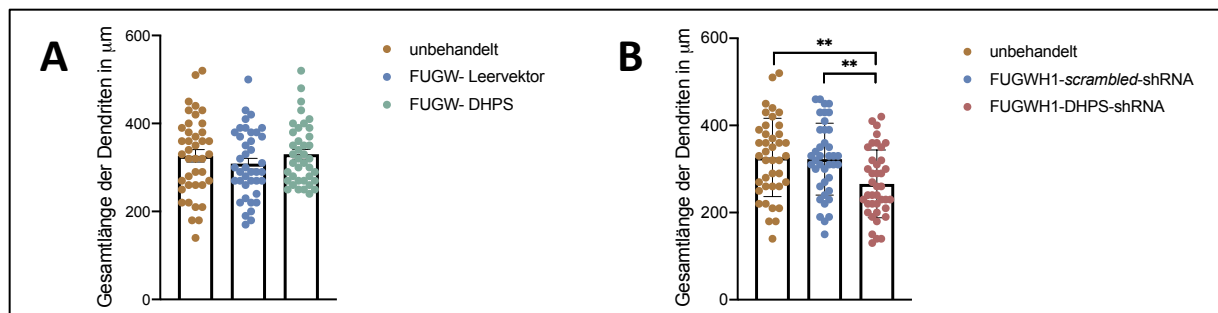


**Abbildung 3.15: Knock-down der DHPS führt zu einer verringerten Arborisierung neuronaler Dendriten**

Nach lentiviraler Infektion neuronaler Primärkulturen an DIV 3 mit FUGWH1-scrambled-shRNA oder FUGWH1-DHPS-shRNA wurden die Kulturen an DIV 21 fixiert. Im Anschluss wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit MAP 2 und eine anschließende Sholl-Analyse durchgeführt. Maßstab: 100 µm (A). Die Infektion mit dem FUGWH1-DHPS-shRNA enthaltenden Virus führte zu einer signifikant verminderten Verästelung der Dendriten im Vergleich zu Neuronen, welche das FUGWH1-scrambled-shRNA Plasmid enthielten (C). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels Two-Way ANOVA und anschließendem Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 10- 15 analysierten Zellen).

### 3.2.3 Auswertung der Dendritenlänge nach DHPS-Überexpression und DHPS-knock-down

Abbildung 3.16 zeigt die durchschnittliche Dendritenlänge der in ihrer DHPS-Konzentration modulierten Neurone. Die primären neuronalen Zellkulturen wurden wie im vorherigen Kapitel 3.2.2 erläutert, behandelt und mikroskopiert. Dabei war zu sehen, dass eine Erhöhung der DHPS-Konzentration in den Neuronen zu keiner Veränderung der Dendritenlänge führte, während Zellen, die den FUGWH1-DHPS-shRNA-Vektor enthielten, durchschnittlich kürzere Dendriten zeigten. Dies deutet auf ein vermindertes Dendritenwachstum durch einen DHPS-knock-down hin.



### Abbildung 3.16: Ein *knock-down* der DHPS führt zu einer Reduktion der maximalen Dendritenlänge

Primäre neuronale kortikale Kulturen der Ratte wurden an DIV 3 mit Lentiviren, welche die Plasmide FUGW-DHPS und FUGWH1-DHPS-shRNA oder als Kontrollgruppen die FUGW-Leervektor oder FUGWH1-*scrambled*-shRNA Plasmide enthielten, infiziert. An DIV 21 wurden die Kulturen fixiert, mit MAP 2 angefärbt und die durchschnittliche Dendritenlänge bestimmt. Die Infektion mit dem Überexpressionskonstrukt FUGW-DHPS führte zu keiner signifikanten Veränderung der Dendritenlänge in Relation zu den mit dem FUGW-Leervektor infizierten oder den unbehandelten Neuronen (A). Der *knock-down* der DHPS durch das FUGWH1-DHPS-shRNA Plasmid führte zu einer signifikanten Längenverringerung der Dendriten gegenüber der Kontrollgruppe (FUGWH1-*scrambled*-shRNA) und den nicht infizierten Neuronen (B). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels One-Way ANOVA und anschließendem Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (\*\* $P < 0.01$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 10- 15 analysierten Zellen).

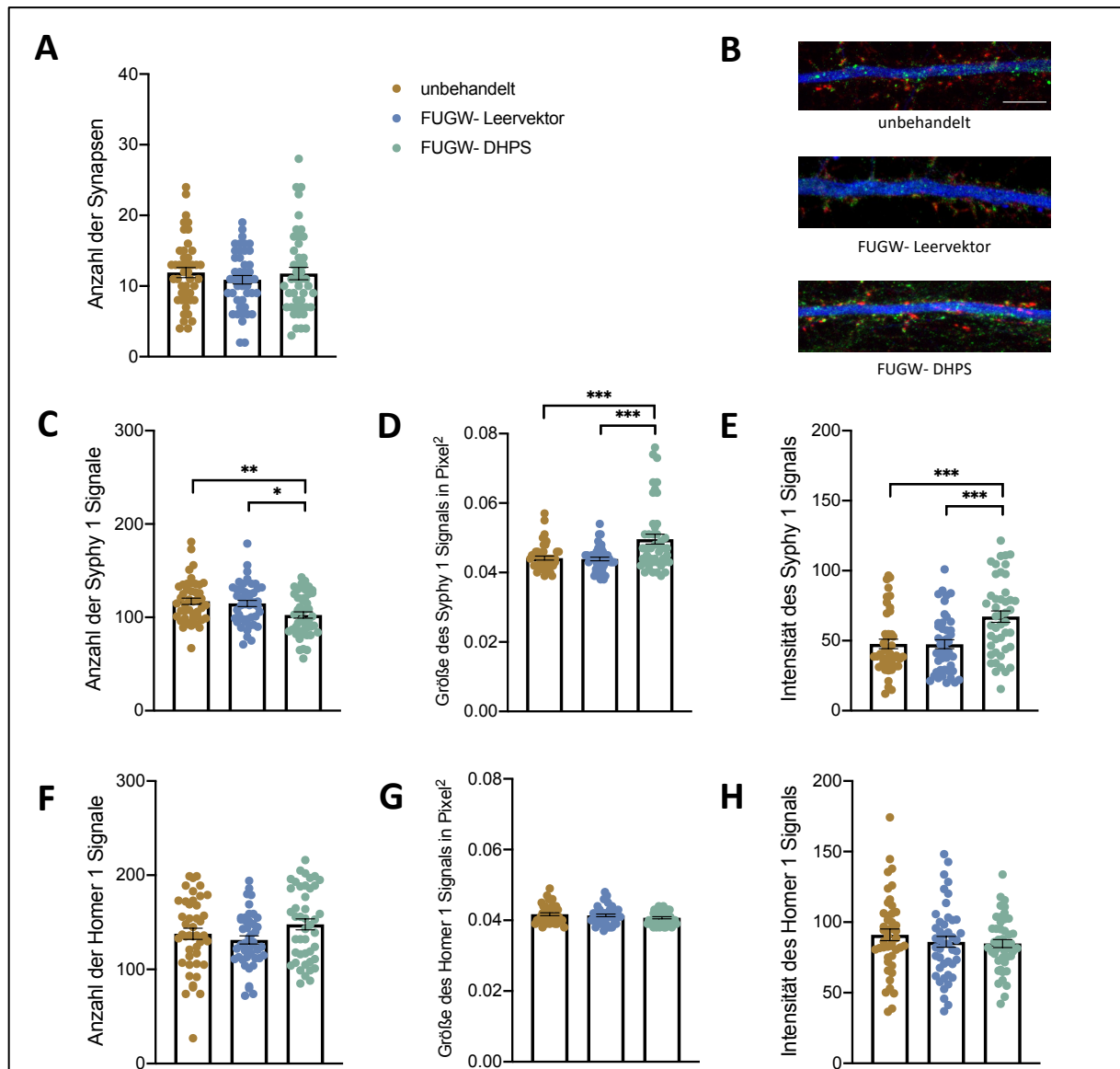
### 3.2.4 Analyse der prä- und postsynaptischen Signale nach DHPS-Überexpression und DHPS-*knock-down*

Zellkulturen, welche die Plasmide FUGW-DHPS und FUGWH1-DHPS-shRNA oder als Kontrollgruppen die Konstrukte FUGW-Leervektor oder FUGWH1-*scrambled*-shRNA enthielten, wurden mit Syphy 1, als präsynaptischen und Homer 1 als postsynaptischen Marker gefärbt. Jeweils die prominentesten primären Dendriten GFP-positiver Neurone wurden hinsichtlich der Anzahl, Größe und Intensität von Prä- und Postsynapsen sowie deren Co-Lokalisation ausgewertet.

Abbildung 3.17 stellt die Quantifizierung der Syphy 1 und Homer 1 Signale von Neuronen, welche das DHPS-Überexpressionskonstrukt enthielten und der entsprechenden Kontrollgruppen dar. Die Überexpression führte zu multiplen Veränderungen des Syphy 1 Signals. Die absolute Anzahl der Syphy 1 Signale war an den primären Dendriten signifikant verringert, wobei die Größe und die Intensität des Signals signifikant zunahm (siehe Abbildung 3.17 C; D; E).

Eine verminderte neuronale DHPS-Konzentration, hervorgerufen durch einen *knock-down*, führte an den analysierten primären Dendriten zu einer herabgesetzten Intensität des prä- und postsynaptischen Markers. Dieser Effekt war insbesondere beim Homer 1 Signal sichtbar (siehe

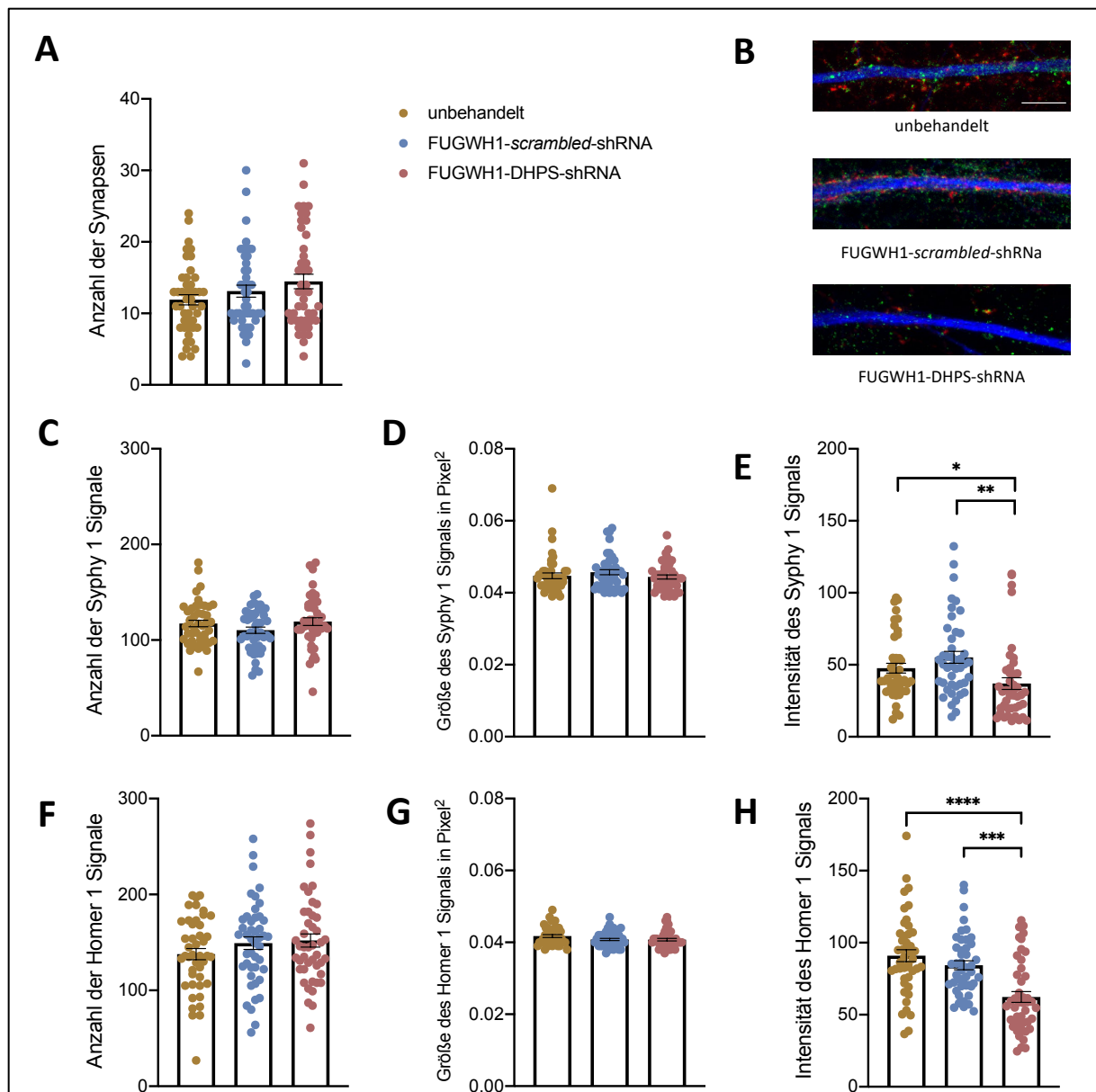
Abbildung 3.18 E, H). Weite Modifikationen der Signale gegenüber den beiden Kontrollgruppen wurden nicht beobachtet.



**Abbildung 3.17: Multiple Veränderungen des Syphy 1 Signals nach Infektion mit dem Überexpressionskonstrukt FUGW-DHPS**

An DIV 3 wurden primäre neuronale Rattenkulturen mit Lentiviren, welche das FUGW oder FUGW- DHPS Plasmid enthielten, infiziert. Nach Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung mit MAP 2 (blau) Syphy 1 (rot) und Homer 1 (grün) wurden Anzahl, Größe und Intensität der Signale gemessen und die Zahl der Synapsen bestimmt. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$  (B). Das Einbringen des Überexpressionskonstruktes FUGW-DHPS resultierte in den infizierten Neuronen in einer signifikanten Verringerung der Anzahl an Syphy 1 Signalen, während ihre Größe und Intensität zunahmen (C, D, E). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels One-Way-ANOVA und anschließendem Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 15 analysierten Zellen).





**Abbildung 3.18: Intensitätsverminderung des Syphy 1 und Homer 1 Signals nach *knock-down* der DHPS**

Die Zellkulturen wurden an DIV 3 mit FUGWH1-scrambled-shRNA oder FUGWH1-DHPS-shRNA enthaltenden Lentiviren infiziert. An DIV 21 erfolgte die Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung mit MAP 2 (blau), Syphy 1 (rot) und Homer 1 (grün). Maßstab: 20  $\mu\text{m}$  (B). Der DHPS-*knock-down* bewirkte eine Intensitätsminderung des Syphy 1 Signals im Unterschied zur FUGWH1-scrambled-shRNA Kontrollgruppe (E). Verglichen mit beiden Kontrollgruppen nahm auch die Intensität des Homer 1 Signals signifikant ab (H). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels One-Way ANOVA und anschließendem Tukey-Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , pro Kondition 3 unabhängige Experimente mit jeweils 15 analysierten Zellen).

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden zunächst an kortikalen Primärkulturen der Ratte *in vitro* die Auswirkungen einer Spermidin-Applikation bei unterschiedlichen Altersstufen untersucht. Darüber hinaus wurde die neuronale Konzentration des an der Hypusinierung des eIF5A beteiligten Enzyms DHPS moduliert. Die Hauptergebnisse waren: Eine Spermidin-Behandlung von 50  $\mu\text{M}$  für 24 h bei alten Neuronen (DIV 84) führte zu einem signifikanten Dendritenwachstum. Auf synaptischer Ebene war nach Spermidin-Applikation ein vergrößertes und intensiveres Signal des präsynaptischen Markers Syphy 1 messbar. Nach dem *knock-down* der DHPS sahen die Neurone weniger vital im Vergleich zu der Kontrollgruppe aus und es waren deutlich weniger Schnittpunkte mit der Sholl-Maske vorhanden. Die Überexpression der DHPS führte bei der Quantifizierung der prä- und postsynaptischen Marker zu Ergebnissen, die den Messungen der Spermidin-Behandlung von DIV 84 Neuronen entsprachen.

### 4.1 Kortikale Primärkulturen als Modellorganismus des Alterns

Als Modellorganismus diente die kortikale Primärkultur der Ratte. Mit diesem Modell können Zellkulturen unterschiedlicher Dichte und unterschiedlichen Alters effektiv in planbarem Umfang hergestellt werden. Die Kultivierung primärer neuraler Kulturen ist eine lang etablierte Methode und wird in vielen Laboren routiniert durchgeführt. Die Verwendung von Neuronen *in vitro* als Modell für das Altern hat noch nicht so viel Beachtung gefunden. Aktuell fehlen noch viele Informationen zur langfristigen Kultivierung von primären neuronalen Zellkulturen [145–147]. Eine ultrastrukturelle Charakterisierung von Neuronen aus kortikalen Primärkulturen der Ratte zeigte, dass die Struktur der Zellorganellen von langfristig kultivierten Neuronen weitgehend derjenigen entspricht, die für Neuronen *in vivo* beschrieben wurde und diese somit als Modell für Untersuchungen des Alterungsprozesses geeignet sind [148]. Ein Großteil der Studien zur zellulären Seneszenz im Gehirn fokussierte sich primär auf Gliazellen [149]. Moreno-Blas et al. stellten die Hypothese auf, dass seneszente Neurone, wenn sie im Gehirn persistieren, zum kognitiven Verfall beitragen, indem sie die synaptische Funktion beeinträchtigen und charakterisierten ein *in vitro* Modell, welches zur Untersuchung der Seneszenz primärer kortikaler Zellen der Ratte geeignet ist. Sie fanden heraus, dass die primären kortikalen Neurone der Ratte in Langzeitkulturen Merkmale der zellulären Seneszenz vor den Gliazellen zeigten und den Alterungsprozess vorantreiben könnten [150].

Im Institut für Pharmakologie und Toxikologie Magdeburg wurde die Langzeitkultivierung von kortikalen Primärkulturen als Modell der Alterung bereits etabliert und ermöglicht die Analyse der Alterung unter kontrollierten Bedingungen [151]. In unserer Studie wurden drei Zeitpunkte berücksichtigt: DIV 21, 42 und 84. Die gewählten Zeitpunkte stellen den Unterschied zwischen

erwachsenen, älteren erwachsenen und sehr alten Neuronen dar. Die verwendeten Kulturen bestehen aus Nervenzellen und Gliazellen, von letzteren waren hauptsächlich Astrozyten vertreten [151]. Somit sind sie mit Co-Kulturen aus Neuronen und Astrozyten vergleichbar. Die Gliazellen bieten den kultivierten Neuronen wichtige Unterstützung [152]. Sie sind essentielle Regulatoren der Bildung, Funktion, Plastizität und Eliminierung von Synapsen [153, 154].

Aus der Literatur ist bekannt, dass Neurone ein dichtes zelluläres Netz zum Überleben benötigen [155–157]. Somit war es notwendig eine Zelldichte zu finden bei der die Neurone bis DIV 84 überlebensfähig sind und gleichzeitig einzelne Zellen, insbesondere bei DIV 21, analysiert werden können. Eine Dichte von 140 Zellen pro  $\text{mm}^2$  zum Zeitpunkt der Ausplattierung stellte sich als eine gute Bedingung dar und ist analog zu Studien an primären kortikalen Zellkulturen der Ratte [158]. Eine Möglichkeit, die Konnektivität einer Zellkultur zu analysieren, erfolgt über synchronisierte *bursts*, da diese über synaptische Übertragungen gesteuert sind und nur dann entstehen, wenn genügend Verbindungen im Netzwerk vorhanden sind [159–161]. Ito et al. zeigten, dass eine Mindestschwelle der Neuronendichte für das Auftreten von synchronisierten Bursts als Zeichen der Viabilität der Zellkultur erfüllt sein muss. Ihre Untersuchungen an primären kortikalen Kulturen der Ratte dokumentierten, dass dafür eine Dichte von 50 Neuronen/ $\text{mm}^2$  benötigt wird [162]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass unsere Zellkulturen als funktionelles Netzwerk agierten.

## 4.2 Quantitative Analyse der Auswirkungen des Alterungsprozesses auf die dendritische Komplexität und synaptische Architektur

### 4.2.1 Untersuchung der neuronalen Morphologie durch Sholl-Analysen und Messung der Dendritenlänge

Zu Beginn wurde die Morphologie der Neurone mittels Sholl-Analyse analysiert, um durch den Alterungsprozess hervorgerufene Veränderungen zu identifizieren. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Abnahme der Anzahl an Schnittpunkten mit der Sholl-Maske in der Nähe des Somas 84 Tage alter Neuronen im Vergleich zu 21 und 42 Tage alten Neuronen (vgl. Abbildung 3.1). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die älteren Neurone durchschnittlich längere Dendriten aufwiesen (vgl. Abbildung 3.6). Diese Ergebnisse stimmen überein mit bereits beschriebenen *in vivo* Daten von menschlichen Gehirnen und Gehirnen weiterer Säugetiere [163–165]. Duan et al. wiesen nach, dass die kortikalen Neurone alter Makaken-Affen viel weniger Dendriten aufwiesen als die junger Affen. Die Sholl-Analyse dieser Neurone ergab eine Verringerung der Anzahl der Dendriten, die sich im Bereich von 140 bis 180  $\mu\text{m}$  vom Soma aus erstrecken [166]. Dies deckt sich mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen. DIV 84 Neurone besaßen weniger Dendriten bis zu einem Abstand von 190  $\mu\text{m}$  vom Soma als die zum Zeitpunkt DIV 21 fixierten Zellen (vgl. Abbildung 3.1). Zu dem gleichen

Ergebnis kamen auch Untersuchungen an postmortalen menschlichen Gehirnen [167]. Einzig die durchschnittliche Dendritenlänge stieg *in vivo* im Gegensatz zu unserem *in vitro* Modell im Laufe des Alterungsprozesses nicht an, sondern blieb konstant oder nahm ab. Die Differenz zu unseren Ergebnissen kann auf verschiedene Variablen zurückzuführen sein. Eventuell ließen die in unserem Experimentaufbau verwendeten Well-Platten durch eine geringere Zelldichte im Vergleich zum Gehirn ein kontinuierliches Wachstum zu. Es könnte sein, dass größere Neurone mehr interzelluläre Kontakte besaßen und somit besser an die Konditionen der Wellplatte angepasst waren und im Laufe der Wochen selektiert wurden. Eine weitere mögliche Erklärung liegt in der Zellauswahl zur Analyse. Die Zellkulturen zeigten zum Zeitpunkt DIV 21 eine höhere Dichte an Neuronen als bei DIV 84 auf, da vermutlich im Laufe der Wochen bereits einige Neurone durch Apoptose verstorben waren. Für die Sholl-Analyse war es wichtig Zellen zu verwenden, die nicht in einem Konvolut mit anderen Neuronen wuchsen. Somit war es auf den DIV 21 und DIV 42 Glasplättchen schwieriger singuläre Zellen für die Sholl-Analyse zu finden. Es ist nicht auszuschließen, dass in der Gruppe der jüngeren Neurone akzidentiell kleinere Zellen zur Analyse ausgewählt wurden, weil diese meist weniger Kontakte zu anderen Neuronen aufweisen und daher visuell leichter zu isolieren sind.

#### 4.2.2 Quantifizierung der Synapsen und prä- und postsynaptischen Signale

Anschließend wurden Veränderungen in den prä- und postsynaptischen Signalen und der Synapsendichte als Indikatoren für eine Beeinträchtigung der interzellulären Kommunikation untersucht. Hier zeigte sich, dass die absolute Anzahl an Synapsen konstant blieb, aber die Intensität des Syphy 1 Signals und die Größe des Homer 1 Signals bei den 84 Tage alten Neuronen im Vergleich zu 21 und 42 Tage alten Neuronen signifikant zunahm (vgl. Abbildung 3.8). In Hinsicht auf die Frage nach der absoluten Anzahl an Synapsen im Laufe des Alterungsprozesses gibt es unterschiedliche Daten. In einigen Untersuchungen nahm mit zunehmenden Alter des Organismus die Anzahl ab, während in anderen Studien die Menge an Synapsen, insbesondere bei Menschen und Tieren ohne geistige Beeinträchtigung, konstant blieb. Im frontalen Kortex von Rhesusaffen fand eine Reduktion der Anzahl von exzitatorischen Synapsen um 30 % statt [106]. Cali et al. zeigten, dass die Dichte aller Synapsen bei gealterten Mäusen signifikant niedriger war, wobei ein signifikanter Rückgang der exzitatorischen Synapsen auf dendritischen Stacheln zu verzeichnen war [168]. Auch bei Ratten zeigte sich eine verminderte Anzahl der Synapsen. Bei älteren kognitiv beeinträchtigten Ratten war die Zahl der präsynaptischen Endigungen in der Frontoparietal-Region um 18 % geringer als bei älteren nicht beeinträchtigten Ratten [169]. Dem stehen mehrere Untersuchungen gegenüber die zeigten, dass die Synapsenzahl im Laufe der Zeit nicht abnahm. Die quantitative elektronenmikroskopische Analyse von Synapsen im mittleren frontalen Kortex von Menschen im Alter von 20 bis 89 Jahren zeigt keine Auswirkungen des Alterns auf die Anzahl der Synapsen [170]. Eine elektronenmikroskopische

Untersuchung des Hippocampus junger und alter Ratten ohne kognitive Einschränkungen zeigte auch keine numerische Veränderung der Synapsen [171]. Häufig kann in ein und derselben Hirnregion eine Art von Synapse reduziert sein, während eine andere in ihrer Anzahl unverändert bleibt [172]. So sahen Geinisman et al. keine offensichtlichen Unterschiede in der Anzahl axodendritischer Synapsen im Gyrus dentatus des Hippocampus zwischen jungen Ratten, alten Ratten ohne kognitive Defizite und alten Ratten mit beeinträchtigtem Gedächtnis. Die alten Ratten mit beeinträchtigter Gedächtnisleistung wiesen dagegen einen erheblichen Verlust an axospinösen Synapsen gegenüber den anderen Gruppen auf [105, 173, 174]. Durch die Verwendung des Antikörpers gegen Homer 1 wurden in dieser Arbeit ausschließlich exzitatorische Synapsen betrachtet. Die Ergebnisse der in dieser Dissertation dargestellten Analyse sind kongruent mit den Daten vorheriger Studien, insbesondere bei Betrachtung des Alterungsprozesses nicht kognitiv beeinträchtigter Säugetiere.

Des Weiteren wurde in der Dissertation die Anzahl, Größe und Intensität der Signale bestimmt. Hier zeigte sich eine Intensitätssteigerung bei den Syphy 1 Signalen und eine Vergrößerung der Homer 1 Signale. Dies deutet auf eine erhöhte Dichte an präsynaptischen Vesikeln und eine größere Postsynapse hin. In der bereits genannten Studie von Cali et al. wurde der Verlust an erregenden Synapsen im somatosensorischen Kortex der alternden Maus durch eine Zunahme ihrer Größe ausgeglichen, so dass die Gesamtmenge an synaptischer Oberfläche pro Längeneinheit des Axons gleich blieb [168]. Einen ähnlichen Effekt könnte die Vergrößerung des Homer 1 Signals in der DIV 84 Gruppe darstellen. Die Untersuchungen der Forschungsgruppe unter Leitung von Nicholson zielten darauf ab, einen möglichen Zusammenhang zwischen altersbedingten Defiziten beim räumlichen Lernen und einer Verminderung der postsynaptischen Dichte (PSD) in exzitatorischen Synapsen des Hippocampus zu evaluieren. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass bei älteren, lernbehinderten Ratten eine signifikante Verminderung der PSD-Fläche um etwa 30 % festgestellt wurde, während dies bei älteren, nicht lernbehinderten Ratten nicht der Fall war [175]. In Autopsieproben des Hippocampus von Menschen mit leichten kognitiven Defiziten war die Größe des PSD-95 Signals, eines zentralen postsynaptischen Gerüstproteins exzitatorischer Neuronen, reduziert [176]. Es ist denkbar, dass die Variationen in der Größe des Homer 1 Signals eine Kompensation für eine potentielle Verminderung der Synapsendichte und Konnektivität darstellen. Die Intensitätssteigerung des Synaptophysin-Signals in alten Kortex-Neuronen (DIV 84) kann auf eine höhere Dichte an synaptischen Vesikeln in der präsynaptischen Zone und eine Zunahme der Größe und Anzahl der aktiven Zonen hindeuten. Die Veränderungen können auf eine Anpassung der neuronalen Schaltungen im Alter zurückzuführen sein, um kognitive Funktionen zu erhalten oder zu verbessern. Sie könnten jedoch auch als ein frühes Anzeichen einer neurodegenerativen Erkrankung wie Morbus Alzheimer gedeutet werden, bei der es zu einer präsynaptischen Dysfunktion kommt. In den initialen Stadien der Alzheimer-Demenz, die

klinisch durch eine milde kognitive Beeinträchtigung charakterisiert wird, kann es vermutlich kompensierend zu einer Zunahme präsynaptischer Endigungen kommen [177]. Im weiteren Verlauf ist die Erkrankung durch ein verringertes Synaptophysin Signal gekennzeichnet [178].

#### 4.3 Charakterisierung der Spermidinwirkung auf kortikale Primärkulturen verschiedener Altersstufen: Eine Untersuchung der dendritischen Komplexität und synaptischen Architektur

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Polyamine Gedächtnisdefizite ausgleichen können [52, 57, 60]. Aus diesem Grund untersuchten wir ihre kurzfristige Wirkung auf die Architektur von Nervenzellen *in vitro*. Spermidin ist das bisher am meisten untersuchte Polyamin in Bezug auf seine Auswirkungen auf die Alterung [74]. Es wird angenommen, dass Spermidin in seiner Fähigkeit Alterungsprozesse zu verlangsamen im Vergleich zu anderen Polyaminen etwas effizienter ist. Zum einen ist Spermidin Substrat der Hypusinierung des Elongationsfaktors eIF5A und kann darüber die Proteinbiosynthese beeinflussen. Zum anderen werden Spermidin und Spermin vermutlich präziser als Putrescin zellulär durch Aminosäuretransporter aufgenommen [179, 180]. Gleichzeitig ist im erwachsenen Gehirn die Konzentration von Spermidin im Vergleich zu den anderen Polyaminen Spermin und Putrescin am höchsten [49]. Dies deckt sich mit der Erkenntnis, dass Spermidin und Spermin in den meisten Säugetierzellen die meist vertretenen Polyamine sind [181, 182]. Wie bereits in Kapitel 1.2 erläutert, ist die Umwandlung von Spermidin in Spermin durch die Spermidin-Synthase reversibel, so dass ein Gleichgewicht zwischen Spermidin und Spermin besteht [15]. Somit kann durch eine Spermidinzufuhr auch der Spermin-Spiegel verändert werden und *vice versa* [183]. Aus diesen Gründen wurde aus der Gruppe der Polyamine Spermidin für die Experimentreihen gewählt.

Julia Abele aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie Magdeburg wies in ihrer Dissertation nach, dass eine Supplementierung mit Spermidin positive Auswirkungen auf bis zu 80 Tage alte primäre kortikale Zellkulturen der Ratte hat. Durch die FUNCAT-Methode wurde beobachtet, dass unbehandelte alternde Zellen einen Abfall in der Proteinneusynthese aufwiesen, unter Supplementierung mit 50  $\mu\text{M}$  Spermidin die Neusyntheserate aber wieder anstieg [151, 184]. Aufgrund dieser *in vitro* Vorarbeiten wurde eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  für die Spermidin-Applikation verwendet.

Die Spermidin-Stocklösung wurde direkt mit  $\text{NB}^+$ , dem Medium der Zellkulturen, hergestellt. Demzufolge wurde keine alleinige Applikation des Lösungsmittels analysiert, sondern die unbehandelten Zellkulturen auch als Kontrolle des Lösungsmittels angesehen. Auf 500  $\mu\text{l}$  Medium, wurden 4  $\mu\text{l}$  der Stocklösung hinzugeben, dies entspricht weniger als 1 % des Gesamtvolumens, sodass

die zusätzliche Nährstoffzufuhr durch NB<sup>+</sup> als vernachlässigbar angesehen wurde. So wurden beispielsweise bei der wöchentlichen Fütterung 10 % des Gesamtvolumens hinzugeben.

#### 4.3.1 Analyse der dendritischen Morphologie von Neuronen unterschiedlicher Altersstufen nach Spermidin-Applikation

Eine Spermidin-Applikation von 50 µM führte bei jungen Neuronen (DIV 21) zu keinen signifikanten Veränderungen. Für 48 h behandelte mittelalte Neuronen (DIV 42) zeigten weniger Überschneidungen mit der Sholl-Maske als zum gleichen Zeitpunkt unbehandelte oder für 24 h behandelte. Der stärkste Effekt wurde bei alten Neuronen gesehen, die für 24 h behandelt wurden. Hier führte die Spermidin-Supplementierung zu einem schnellen Wachstum von Dendriten. Überraschenderweise ist die Zunahme der Dendritenzahl in der Gruppe, welche für 48 h behandelt wurde, nicht sichtbar. In ihrer Morphologie ähneln für 24 h mit Spermidin behandelte alte Neurone den unbehandelten jungen Neuronen, was auf einen Rejuvenations-Effekt hindeutet (vgl. Abbildung 3.5). Jorratt et al. behandelten analog zu unserer Studie kortikale Primärkulturen der Wistar Ratte an DIV 14 für 5 Tage mit 50 µM Spermidin und sahen keine wesentlichen Veränderungen der dendritischen Struktur [158]. Dies ist vergleichbar mit unserer Gruppe der jungen Neuronen (DIV 21) (siehe Abbildung 3.2). Auch hier führte die Spermidin-Applikation zu keinen grundlegenden Aberrationen der Sholl-Analyse. Eine bereits 30 Jahre alte Studie von Chung et al. ergab, dass die Anwendung von Spermidin bei primären Hippocampus-Neuronen (DIV 3) *in vitro* zu keiner signifikanten Veränderung in der Anzahl der Dendriten führte [185]. Nach Durchsicht von PubMed, Google Scholar, Scopus und Cochrane Library mit den Stichworten „spermidine“ und „dendritic growth“, „neuritogenesis“ oder „sholl-analysis“ wurde keine Studie gefunden, die eine morphologische Analyse von alternden Kortex-Neuronen unter Spermidin-Applikation durchgeführt hat. (Stand Januar 2023). Somit gibt es aktuell keine äquivalenten Studien, die mit den Ergebnissen dieses Abschnittes der Arbeit vergleichbar sind.

Wie genau Spermidin die Neuritogenese beeinflusst ist noch nicht vollständig verstanden. Es wurde aber in multiplen Studien gezeigt, dass Spermidin eine Wirkung auf Mechanismen hat, welche zentrale Bedeutungen für eine ausgeglichene Proteinhomöostase und somit auch für das dendritische Wachstum innehaben. Die Hauptmechanismen der Spermidin-Wirkung sind die Aktivierung der Autophagie und die Hypusinierung des eIF5A [186]. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben sind die Autophagie-induzierenden Eigenschaften von Spermidin essentiell für dessen Wirkung auf die Lebensspanne. Gleichzeitig kann eine Veränderung der Autophagie auch die dendritische Verzweigung modulieren. In *Drosophila melanogaster* reduzierte die Ausschaltung von Autophagie-Genen das Wachstum der dendritischen Äste und die terminale Verzweigung in multidendritischen sensorischen Neuronen [187]. In einer Studie von Ban et al. führte sowohl eine pharmakologische Induktion als auch

eine Inhibition der Autophagie in jungen (DIV 3) kortikalen Primärkulturen zu keinen Veränderungen der absoluten Dendritenlänge [188].

Es wäre von Interesse zu untersuchen, ob eine Hemmung der Autophagie, beispielsweise durch Chloroquin, das Spermidin-induzierte Dendritenwachstum in unserem Modell reduzieren oder verhindern würde [189]. Die Bedeutung der positiven Auswirkungen der Autophagie und Hypusinierung von eIF5A auf die Proteinhomöostase ist speziell für Dendriten und Synapsen wahrscheinlich entscheidend. Dies liegt an der räumlichen Entfernung zum Zellkern sowie dem langsamen Transport zytoskelettaler Proteine bei einer dynamischen Morphologie. Um die Entfernung auszugleichen ist es notwendig, dass Proteine kontinuierlich abgebaut werden und eine aktive Proteinsynthese vorhanden ist [190, 191]. Gleichzeitig hat die Zellalterung einen negativen Einfluss auf die Proteinbiosynthese und führt zu einer Steigerung der Ribosomenaggregation, was wiederum zur Instabilität der Proteinhomöostase beiträgt [192]. Wie bereits in Kapitel 1.4 dargestellt, tritt eine altersbedingte Verarmung von eIF5A auf, die von einer gleichzeitigen Ansammlung von inaktiven Ribosomen begleitet wird. Darüber hinaus kann eine Spermidin-reiche Ernährung den Spiegel des hypusinierten eIF5A erhöhen. Eine Verbesserung der Proteinhomöostase durch Spermidin könnte das Dendritenwachstum in den gealterten Neuronen gefördert haben.

Eine weitere Erklärung liegt in der Erhöhung von neurotrophen Faktoren wie Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) und Nerve Growth Factor (NGF). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Stimulation des Dendritenwachstums und dem Überleben von Neuronen *in vivo* und *in vitro* [193–195]. Gleichzeitig nehmen ihre Konzentrationen im Laufe des Alterungsprozesses in verschiedenen Organismen ab [196–198]. *In vivo* und *in vitro* führte eine Spermidin-Applikation zu einer Erhöhung des BDNF-Spiegels, wobei die *in vitro* durch Spermidin hervorgerufene Neuritogenese durch einen BDNF-Inhibitor blockiert wurde [199, 200]. Eine Spermidin induzierte BDNF-Erhöhung könnte ein möglicher Mechanismus sein, über den die Neuritogenese in den alten Neuronen stimuliert wurde. Dabei ist zu beachten, dass die vorliegenden Mechanismen sich wechselseitig beeinflussen. Huang et al. zeigten, dass die NGF-vermittelte Neuritogenese abhängig von der Hypusinierung des eIF5A ist [48].

Auch die Fütterungsmethode der Zellkulturen könnten eine Rolle gespielt haben. Wie bereits im vorherigen Kapitel erläutert, wurde den Zellkulturen wöchentlich frisches NB<sup>+</sup> beigefügt. Durch eine Proliferation der Glia-Zellen könnte jedoch der Energie- oder Nährstoffbedarf der Well-Platte im Laufe des Alterungsprozesses steigen. Ein potentieller Mangelzustand könnte die Spermidin-Wirkung verstärkt haben. Eine Möglichkeit, dies in einer Reproduktion des Experiments zu berücksichtigen, wäre die Nährstoffzufuhr im Laufe der Wochen kontinuierlich zu steigern oder eine Woche vor der Spermidin-Applikation einen kompletten Mediumwechsel vorzunehmen. Eine weitere Erklärung



könnte sein, dass die Spermidin-Behandlung für alternde Neurone eine Stresssituation darstellt, welche zu der beobachteten Dendritenproliferation führte. Eine Abnahme der Dendritenzahl innerhalb von 48 h nach Spermidin-Behandlung könnte auch als früher Indikator für eine bevorstehende zelluläre Nekrose angenommen werden. Dieser möglichen Interpretation steht jedoch gegenüber, dass Julia Abele in Vorstudien ihrer Dissertation alternde Neurone eine Woche nach 50  $\mu$ M Spermidin-Exposition untersuchte und keine Anzeichen für einen Zelltod feststellen konnte.

Die Spermidin-Behandlung der kortikalen Primärkulturen führte bei den Entwicklungsstadien DIV 21, DIV 42 und DIV 84 nicht zu signifikanten Veränderungen der Dendritenlänge (siehe Abbildung 3.6). Die Arbeitsgruppen um Jorratt und Chu maßen die Gesamtlänge der Dendriten *in vitro* nach Applikation von Spermidin und stellten ebenfalls keine signifikanten Modifikationen fest [158, 185].

Neben den bereits erwähnten Veränderungen des Modells durch modifizierte Fütterung und Anwendung von Chloroquin könnten auch die Zeitfenster, innerhalb derer die Neuronen untersucht werden, verkürzt werden. Um ein detailliertes Verständnis zu erlangen, könnten beispielsweise gealterte Neuronen zusätzlich 12 h und 36 h nach der Spermidin-Applikation untersucht werden, um die Zeitspanne zu bestimmen zu können, in dem das verstärkte Dendritenwachstum beginnt und ab wann die Reduktion der Dendriten einsetzt. Darüber hinaus könnte eine Lebendzell-Bildgebung zusätzliche präzise Informationen liefern. In unserem Modell wurden nur die kurzfristigen Wirkungen von Spermidin untersucht. Daher wäre es auch von Interesse, die Wirkungen einer langfristigen Spermidin-Behandlung über mehrere Tage zu verfolgen.

#### 4.3.2 Spermidin-induzierte Veränderungen der synaptischen Morphologie

Eine Analyse von prä- und postsynaptischen Markern wurde am prominentesten primären Dendriten durchgeführt, um die Auswirkungen der Spermidin-Behandlung auf junge (DIV 21), mittelalte (DIV 42) und alte (DIV 84) Neurone zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Spermidin-Behandlung zu Veränderungen in der Intensität des Syphy 1 Signals bei DIV 21 und 42 geführt hat (siehe Abbildung 3.9/Abbildung 3.10). In der bereits genannten Studie von Jorratt et al. führte eine 50  $\mu$ M Spermidin-Behandlung bei primären kortikalen Rattenkulturen der Entwicklungsstufe DIV 14 zu keinen signifikanten Veränderungen der Synapsenanzahl und der prä- und postsynaptischen Dichte [158]. Besonders interessant sind die Veränderungen, die innerhalb dieser Dissertation in den DIV 84 Neuronen beobachtet wurden. Die Spermidin-Applikation für 24 h und 48 h führte zu einer reduzierten Anzahl der Syphy 1 Signale aber einer Zunahme ihrer Intensität. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Sholl-Analyse glichen die Messungen nach 24-stündiger Spermidin-Behandlung nicht den Daten der jungen Neuronen, sondern die bereits beim Alterungsprozess gesehenen Veränderungen des Syphy 1

Signals wurden durch Spermidin verstärkt (siehe Abbildung 3.11 & Abbildung 3.12). Das legt nahe, dass in den mit Spermidin behandelten, gealterten Neuronen eine Zunahme von synaptischen Vesikeln und aktiven Zonen zu verzeichnen ist. In einer elektronenmikroskopischen Untersuchung von Maglione et al. wurde in gealterten Mäuse-Hippocampi eine signifikante Verringerung der Dichte an synaptischen Vesikeln beobachtet. Mäuse, die eine 6-monatige Spermidin-Behandlung erhielten, zeigten jedoch keine altersbedingte Verringerung der Vesikeldichte, sondern eine Dichte, die mit der von jungen Mäusen vergleichbar war [111]. In *Drosophila melanogaster* wurde eine altersabhängige Vergrößerung der präsynaptischen Zone gefunden, die durch Spermidin reduziert wurde [60]. In den beiden vorgestellten Studien hatte Spermidin in den Modellorganismen einen Effekt, der eine zu jungen Tieren vergleichbare Situation erneut herstellte. Dabei muss beachtet werden, dass die Seneszenz zu unterschiedlichen Veränderungen an der Präsynapse geführt hat und die beiden vorgestellten Studien eine Langzeitbehandlung mit Spermidin untersuchten. Aus der Literatur ist ersichtlich, dass der Alterungsprozess einen Einfluss auf die Präsynapse hat, dabei wurden in verschiedenen Modellorganismen eine Reihe von Veränderungen und auch gegensätzliche Entwicklungen gezeigt. Doch insbesondere in den Hirnregionen, die für das Lernen und Gedächtnis verantwortlich sind, nimmt die Syphy-Konzentration im Alterungsprozess ab [108, 201]. In Kapitel 4.2 habe ich die Überlegung geäußert, dass die Veränderungen im Syphy 1 Signal in den unbehandelten DIV 84 Neuronen möglicherweise auf Anpassungen der neuronalen Schaltungen im Alter zurückzuführen sind, um die kognitiven Funktionen aufrechtzuerhalten oder zu verbessern. Die Verabreichung von Spermidin könnte diesen Anpassungsprozess intensiviert haben. Dem gegenüber steht, dass eine kurzfristige Anwendung von Rapamycin, einem Wirkstoff, der in seiner Wirkung auf die Autophagie der von Spermidin ähnlich ist, zu einer Verminderung der Zahl an synaptischen Vesikeln in dopaminergen Neuronen geführt hat [202]. Es bestehen multiple Mechanismen, welche zu einer Steigerung des Syphy 1 Signals geführt haben können. Aber bemerkenswert ist, dass die Veränderungen des Syphy 1 Signals in den gealterten Kortex-Neuronen analog zu den Daten der DHPS-Überexpression sind. Das Einbringen des Überexpressionskonstruktes führte an den primären Dendriten zu einer verringerten Anzahl an Syphy 1 Signalen bei gleichzeitiger Vergrößerung und Intensitätssteigerung. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Änderungen des Syphy 1 Signals auf eine gesteigerte Proteinbiosynthese infolge der Hypusinierung von eIF5A zurückzuführen sind.

Es ist naheliegend, dass solche Veränderungen im Synapsenaufbau zu Funktionsänderungen führen können. Allerdings kann eine Aussage über die Konnektivität einer Synapse nicht direkt aus den Veränderungen im Homer 1 und Syphy 1 Signal abgeleitet werden [203]. Es kann davon ausgegangen werden, dass das gesteigerte Syphy 1 Signal auf eine vergrößerte Anzahl an synaptischen Vesikeln und auch potentiell der aktiven Zonen zurückzuführen ist. Eine vertiefte Analyse mithilfe von Bassoon,

einem Gerüstprotein der Präsynapse, welches als Marker für die aktive Zonen genutzt wird oder eine immunzytochemische Färbung mit einem Antikörper gegen PSD-95, um eine genauere Analyse der postsynaptischen Dichte zu ermöglichen, könnten nützliche Schritte sein, um einsichtsreichere Schlüsse über Veränderungen im Synapsenaufbau zu erlangen [204]. In einigen Studien (siehe Kapitel 1.5.1.1) nahm im Laufe der Alterung das Western-Blot-Signal von wichtigen prä- und postsynaptischen Proteinen ab, wie auch in der Studie von Bertrand et al.. Dort blieben *in vitro* gealterte Hippocampus-Neurone bis zu 45 Tage zahlenmäßig unverändert, verloren aber Marker für die synaptische Dichte und das dendritische Netzwerk wie PSD-95 und MAP 2 [205]. Eine Immunoblot-Analyse der Proteinmenge von Syphy 1 und Homer 1 könnte noch aufzeigen, ob die Signaländerungen auch mit Konzentrationsänderungen der Gesamtproteinmenge einhergehen. Eine vermehrte Anzahl an synaptischen Vesikeln muss nicht zwangsläufig eine vermehrte Bereitstellung von Neurotransmittern bedeuten, da es aufgrund von Beeinträchtigungen des Recyclingprozesses, zu einer Akkumulation von inaktiven synaptischen Vesikeln kommen kann [206]. Das Recycling synaptischer Vesikel ist ein komplexer Prozess, der von entscheidender Bedeutung für den Erhalt und die Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit von Synapsen ist. Hierbei werden synaptische Vesikel, die an der Synapse freigesetzt wurden, zurück zu ihrem Ursprungsort, dem Endoplasmatischen Retikulum, transportiert, wo sie neu befüllt und wieder bereit für die nächste Freisetzung gemacht werden [207]. Interessant wäre es auch den Recyclingprozess der Vesikel genauer zu analysieren, um zu bestimmen, ob die Steigerung des Syphy 1 Signals eine Akkumulation von alten Vesikeln bedeutet oder insgesamt mehr aktive Vesikel im Umlauf sind. Eine Möglichkeit, sich dieser Frage zu nähern, wäre eine Live-Zell-Bildgebung mit einem fluoreszierenden Antikörper gegen ein Vesikelprotein. Darüber hinaus könnten elektrophysiologische Single-cell-Analysen möglicherweise dazu beitragen, weitreichendere Erkenntnisse über Veränderungen in der Aktivität der Synapse zu gewinnen.

#### 4.4 Genetische Modulation der neuronalen DHPS-Konzentration

Der Alterungsprozess ist durch eine Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese gekennzeichnet [17, 208]. Ein wichtiger Bestandteil der Proteinbiosynthese ist die Translation, die Übersetzung einer mRNA-Sequenz in eine Aminosäurekette. Die Translation kann in drei Phasen unterteilt werden: Initiation, Elongation und Termination. Für jede dieser Phasen gibt es eine Vielzahl an Proteine, die den Prozess unterstützen. Studien an Hefezellen haben eIF5A als dritten bedeutenden Translationselongationsfaktor neben eEF1A und eEF2 identifiziert [34]. Viele Wirkungen von Spermidin lassen sich auf seine Bedeutung für die posttranslationale Hypusinierung von eIF5A zurückführen. Die Aktivierung des eIF5A erfolgt durch die Hypusinierung eines Lysinrestes, katalysiert durch die Wirkung der Enzyme DHPS und DOHH. Die Hypusinierung von eIF5A nimmt mit dem Altern *in vivo* ab und kann durch eine Nahrungsergänzung mit Spermidin wiederhergestellt werden (vgl. Kapitel 1.4). Das

bemerkenswerteste Merkmal der Hypusin-Modifikation ist die strikte Spezifität für eIF5A. Es wurde bislang kein anderes Protein identifiziert, das Hypusin enthält. Weder DHPS noch DOHH sind in der Lage, freie Aminosäuren zu modifizieren. Vielmehr ist für beide Enzyme die Vorlage der makromolekularen Struktur des eIF5A als Reaktionssubstrat erforderlich [86, 209, 210]. Mehrere Modelle zeigten, dass das durch DHPS gebildete Zwischenprodukt stabil blieb und der eIF5A nicht in seine inaktive Form zurücktransformierte [211–213]. Für die bessere Analyse des Hypusinierungsprozesses wurde die zelluläre Konzentration des Enzyms DHPS modifiziert. In Kapitel 3.2.1 wurde die Effektivität der Konstrukte beschrieben. Es existieren zwei Isoformen des eIF5A, die sich im Bereich der Hypusinierungsstelle am  $\text{Lys}_{50}$  nicht unterscheiden, aber unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen. Während eIF5A1 ubiquitär exprimiert wird, findet man eIF5A2 hauptsächlich in Tumorzellen und lediglich in moderaten Mengen im Gehirn [214]. Eine Spezifität des Enzyms DHPS für eine der beiden eIF5a-Isoformen ist gegenwärtig nicht bekannt. Somit gehen wir davon aus, dass das von uns verwendete DHPS-Konstrukt an der Hypusinierung beider Isoformen beteiligt sein könnte. Da die Isoform eIF5A2 in gesundem Gewebe nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommt, beziehen sich die meisten zitierten Paper in dieser Arbeit auf die Isoform eIF5A1 [215].

#### 4.4.1 Veränderungen der dendritischen Morphologie unter modifizierter DHPS-Konzentration

Die Überexpression der DHPS führte im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Neuronen die den FUGW-Leervektor enthielten nicht zu signifikanten Veränderungen. Dabei ist zu beachten, dass die Einbringung des FUGW-Leervektors zu vermehrten Überschneidungen mit der Sholl-Maske im Unterschied zu den unbehandelten Neuronen führte. Da nicht differenzierbar ist, ob die Veränderungen auf den Vektor oder das Konstrukt zurückzuführen sind und sowohl die FUGW-Leervektor als auch die FUGW-DHPS Gruppe ein vermehrtes Dendritenwachstum aufwiesen, gehen wir davon aus, dass die Wirkung vom FUGW-Vektor hervorgerufen wurde und die DHPS-Überexpression zu keinen Modifikationen der neuronalen Struktur führte (vgl. Abbildung 3.14). Dies lässt darauf schließen, dass das Enzym DHPS bezüglich dendritischer Morphologie nahe an seiner Sättigungsgrenze arbeitet und die begrenzenden Faktoren in dieser Hinsicht nicht die Enzymkonzentration oder -aktivität betreffen. Hingegen führte ein *knock-down* zu signifikanten Veränderungen, einschließlich einer deutlichen Abnahme der Überschneidungen mit der Sholl-Maske und einer verkürzten Dendritenlänge. Diese Ergebnisse wurden durch die Daten von Huang et al. bestätigt, die zeigten, dass eine Inhibierung der DHPS sowohl durch den selektiven Inhibitor GC-7 als auch durch RNA-Interferenz zu einem verminderten Neuritenwachstum führte [48]. Eine *in vivo* Studie an Mäusen zeigte, dass ein konditioneller *knock-out* von eIF5A oder DHPS in Neuronen eine

signifikante Beeinträchtigung des Wachstums, der Lebensfähigkeit, der Neuroentwicklung und der kognitiven Funktionen hervorruft. Die Untersuchung offenbarte, dass eIF5A- oder DHPS-defiziente Mäuse ein reduziertes Hirnvolumen und eine geringere Anzahl an Neuronen und Synapsen aufwiesen. Zudem zeigten diese Mäuse im Vergleich zu ihren normalen Artgenossen eine deutlich verminderte kognitive Leistung, insbesondere hinsichtlich Lern- und Gedächtnisfunktionen. [119]. Eine verminderte DHPS-Wirkung kann auch bei Menschen Auswirkungen auf die kognitiven Funktionen haben. Ganapathie et al. zeigten, dass seltene Mutationen der DHPS zu einer verminderten Enzymaktivität führen, die die Hypusinierung von eIF5A einschränkt und bei den Betroffenen mit einer neurologischen Entwicklungsstörung verbunden ist [118].

#### 4.4.2 Veränderungen der synaptischen Signale unter modifizierter DHPS-Konzentration

Sowohl die Überexpression als auch der *knock-down* der DHPS führten zu keinen signifikanten Veränderungen der Synapsenzahl. Die DHPS-Überexpression führte zu einer Abnahme der Anzahl der Syphy 1 Signale, während diese gleichzeitig größer wurden und in ihrer Intensität zunahmen. Eine Veränderung des Homer 1 Signals war bei den Neuronen, welche das Überexpressionskonstrukt enthielten, nicht sichtbar. Der *knock-down* führte sowohl zu einer Intensitätsminderung des Syphy 1 als auch des Homer 1 Signals. Interessanterweise sind die Veränderungen des Syphy 1 Signals in Folge der DHPS-Überexpression kongruent zu den Ergebnissen der Spermidin-Applikation bei gealterten Neuronen. Das lässt darauf schließen, dass dieser Mechanismus essentiell für die Veränderungen des synaptischen Signals ist und sowohl Konzentrationsveränderungen des Substrats, als auch des Enzyms zu ähnlichen Modifikationen führen. Nishimura et al. sahen *in vitro*, dass die Menge an aktivem eIF5A in den Zellen stark von der Spermidinkonzentration abhängig ist [216]. Zusätzlich fanden Lubas et al. heraus, dass die Translation von ATG 3, einem wichtigen Protein der Autophagie, abhängig von eIF5A ist. Daher kann geschlossen werden, dass eIF5A eine essentielle Rolle bei der Bildung von Autophagosomen spielt [217]. Somit könnte eine erhöhte DHPS-Konzentration auch die Autophagie erhöhen und für die gemessenen Veränderungen der Synapsen verantwortlich sein.

Es ist wahrscheinlich, dass eine Überexpression oder ein *knock-down* der DHPS auch zu Konzentrationsveränderungen des hypusinierten eIF5A geführt hat. Zu beachten ist jedoch, dass die Hypusinierung von verschiedenen Faktoren wie NAD, pH-Wert, der Metabolitenkonzentration und der Aktivität der beteiligten Enzyme DHPS und DOHH abhängt [218]. Als nächster Schritt sollte mittels Western-Blot-Analyse untersucht werden, ob eine Modulation der DHPS-Expression tatsächlich zu Veränderungen der Hypusinkonzentration führt. Zusätzlich könnte ein Hypusin-Assay durchgeführt werden, um zu ermitteln, ob und inwieweit Spermidin in unserem Modell die hypusinierte eIF5A-

Konzentration erhöht und ob dies proportional zur Spermidinkonzentration ist oder Schwellenwerte existieren. Im Rahmen der Experimente von Nishimura et al. wurde ein unterer Grenzwert für die Spermidinkonzentration identifiziert, dessen Unterschreitung eine Abnahme des Gehalts an aktiven eIF5A-Molekülen zur Folge hatte [216].

## 4.5 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Spermidin-Supplementierung und eine Modulation der DHPS-Konzentration zu Veränderungen der dendritischen und synaptischen Struktur *in vitro* geführt haben. Aktuell werden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der OVGU Magdeburg Untersuchungen zur Wirkung einer kurzfristigen Spermidin-Applikation auf Kortexgewebe *in vivo* untersucht. Dies kann dazu beitragen, ein besseres Verständnis dafür zu gewinnen, welchen Einfluss Spermidin auf neuronale Strukturen hat.

Die multifaktoriellen Wirkmechanismen von Spermidin - aufgrund der Beteiligung an multiplen Stoffwechselprozessen - ermöglichen eine Vielzahl an Fragestellungen und potentiellen Anwendungen. Neben den möglichen Vorteilen als Nahrungsergänzungsmittel ist es in den letzten Jahren auch als Biomarker zur Risikostratifizierung von Demenzerkrankungen oder Schlaganfall in den Fokus geraten. Bei diesen Prozessen wurde eine erhöhte Spermidinkonzentration im Blut beobachtet [219–221]. Wie dies mit den positiven Wirkungen auf neurodegenerative Erkrankungen und die Gedächtnisleistungen in Einklang gebracht werden kann, ist Gegenstand aktueller Diskussion. Darüber hinaus bestehen bei der Etablierung von Spermidin als *Anti-Aging*-Mittel viele weitere Fragen. Zum einen ist noch nicht vollständig geklärt, inwieweit der Spermidinspiegel im Gehirn durch eine orale Supplementierung ansteigt. Auch wenn bereits aufgezeigt wurde, dass eine Spermidinzufuhr zu einer Erhöhung des Serumspiegels führen kann, ist die Aufnahme von Spermidin von vielen verschiedenen Faktoren abhängig [25, 26]. Insbesondere das individuelle Mikrobiom steht hierbei im Fokus. Indem es die Produktion, den Verbrauch und Stoffwechsel von Polyaminen moduliert, beeinflusst es auch den Spermidinspiegel im Darm [222]. Zusätzlich ist die Permeabilität der Blut-Hirnschranke für Polyamine streng reguliert, sodass bei einem erhöhten Blutserumspiegel nicht automatisch auch von einer Konzentrationssteigerung im Kortex ausgegangen werden kann [223]. In den aufgeführten klinischen Studien konnte für Spermidin ein kurzfristiger Effekt auf die Gedächtnisleistung nachgewiesen werden, unklar ist aber noch, ob eine langfristige Einnahme von Spermidin positive Wirkungen auf kognitive Fähigkeiten besitzt (vgl. Kapitel 1.3.2) [79, 80]. Um eindeutige Aussagen zu gewährleisten, bedarf es weiterer klinischer Studien.

Für ein gesundes Altern bei regem Geist sind zahlreiche Faktoren von Bedeutung und es scheint unwahrscheinlich, dass es eine einfache Lösung wie eine „*Anti-Aging*-Pille“ geben wird. In den letzten Jahren hat sich herauskristallisiert, dass ein Lebensstil, der regelmäßige körperliche Aktivität, eine ausgewogene Ernährung und kognitive Stimulation beinhaltet, eine bedeutende Rolle bei der erfolgreichen Alterung spielt [224–228]. Die soziale Integration stellt ebenfalls einen wichtigen Faktor dar und es obliegt der Verantwortung unserer Gesellschaft, ältere Menschen besser in die Gemeinschaft zu integrieren und Lebensräume zu gestalten, die sowohl den Bedürfnissen älterer als auch jüngerer Menschen gerecht werden [229, 230].

## 5 Zusammenfassung

Die durchschnittliche Lebenserwartung steigt weltweit und mit ihr die Häufigkeit altersbedingter Krankheiten. Insbesondere das zentrale Nervensystem ist dem fortschreitenden Alterungsprozess unterworfen. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass Proteinhomöostase und Autophagie Schlüsselfaktoren bei diesen Prozessen sind. Die Verabreichung von exogenem Spermidin, einem Autophagie-Induktor, verlängert nachweislich die Lebensspanne, verbessert die neuronalen und kognitiven Funktionen und erwies sich in verschiedenen Modellorganismen als neuroprotektiv. Diese Wirkungen könnten zum Teil auf seinen Beitrag zur Hypusinierung, einer einzigartigen posttranslationalen Modifikation des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 5A-1 (eIF5A) zurückzuführen sein. Daher war das Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen von Spermidin und der eIF5A-Hypusinierung auf die neuronale Plastizität zu analysieren. Dafür wurden zwei Experimentreihen durchgeführt. Im ersten Teil wurde primären kortikalen Zellkulturen der Ratte zu den Zeitpunkten DIV 21, DIV 42 und DIV 84 für 24 h oder 48 h Spermidin in einer Konzentration von 50  $\mu$ M appliziert. Um die Rolle der Hypusinierung des eIF5A weiter zu analysieren, wurde in einem zweiten Experiment die zelluläre Konzentration der an der Modifikation beteiligten Desoxyhypusinsynthase (DHPS) verändert. In beiden Experimentreihen wurde die Morphologie der Dendriten mittels Sholl-Analyse beurteilt. Die Beurteilung der Veränderungen auf synaptischer Ebene wurde über eine Quantifizierung der prä- und postsynaptischen Signale am prominentesten primären Dendriten durchgeführt. Eine 24-stündige Behandlung mit Spermidin beschleunigte das dendritische Wachstum in DIV 84 Neuronen und sie glichen in ihrer Morphologie wieder jüngeren Neuronen. Auf synaptischer Ebene war nach Spermidin-Applikation der alten Neuronen (DIV 84) ein vergrößertes und intensiveres Syphy 1 Signal und eine Abnahme der Homer 1 Signalgröße sichtbar. Zur besseren Interpretation dieser Ergebnisse wäre eine detaillierte Analyse des Einflusses von Spermidin auf die synaptische Plastizität und deren mögliche Rolle bei der Verjüngung von Neuronen sinnvoll. Die Überexpression von DHPS führte zu keinen signifikanten Veränderungen in den dendritischen Überschneidungen mit der Sholl-Maske, während der *knock-down* zu einer Verringerung führte. Dies deutet darauf hin, dass die endogene Hypusinierung des eIF5a ausreichend ist und nahe der Sättigung arbeitet. Gleichzeitig agiert die DHPS in einem engen Konzentrationsfenster und hat eine zentrale Bedeutung, so dass ein *knock-down* einen signifikanten Effekt auf die Morphologie der Neuronen hat. Die Überexpression der DHPS führte bei der Quantifizierung der prä- und postsynaptischen Marker zu Ergebnissen die analog zu den Messungen der Spermidin-Behandlung von DIV 84 Neuronen waren, was den zentralen Wirkungsmechanismus von Spermidin über eine Aktivierung des eIF5a bestätigt. Das ZNS muss jedoch letztendlich als Netzwerk aus allen neuronalen Zellspesies und in seiner Interaktion mit dem gesamten Organismus betrachtet werden. Eine Analyse des Einflusses von Pharmaka auf vereinzelte Zellarten



wird der Situation *in vivo* nicht gerecht. Dennoch stellt die Untersuchung der Auswirkungen von Spermidin auf die Neuronen einen wichtigen Fortschritt auf dem Weg zur Entwicklung von *Anti-Aging*-Therapeutika dar, welche der wachsenden Zahl alter und sehr alter Menschen eine längere Gesundheit und Selbständigkeit ermöglichen könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Oeppen J, Vaupel JW: Broken Limits to Life Expectancy. *Science* 296, 1029–1031 (2002)
2. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019): World population prospects Highlights, 2019 revision Highlights, 2019 revision.
3. Restrepo HE, Rozental M: The social impact of aging populations: Some major issues. *Soc Sci Med* 39, 1323–1338 (1994)
- 4.: World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. 87
5. Behrendt H, Runggaldier K: Ein Problemaufriss über den demographischen Wandel in der Bundesrepublik Deutschland. *Notf Rettungsmedizin* 12, 45–50 (2009)
6. Pilleron S, Sarfati D, Janssen-Heijnen M, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Soerjomataram I: Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: A population-based study. *Int J Cancer* 144, 49–58 (2019)
7. Harada CN, Natelson Love MC, Triebel K: Normal Cognitive Aging. *Clin Geriatr Med* 29, 737–752 (2013)
8. Murman DL: The Impact of Age on Cognition. *Semin Hear* 36, 111–121 (2015)
9. Bishop NA, Lu T, Yankner BA: Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 464, 529–535 (2010)
10. Deutsche Alzheimer Gesellschaft (2019) Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. Informationsblätter der Deutschen Alzheimer Gesellschaft 2019, online verfügbar unter: [https://alzheimer-mv.de/wp-content/uploads/2021/09/infoblatt1\\_haeufigkeit\\_demenzerkrankungen\\_dalzg.pdf](https://alzheimer-mv.de/wp-content/uploads/2021/09/infoblatt1_haeufigkeit_demenzerkrankungen_dalzg.pdf), zuletzt geprüft am 28.03.23
11. Michalowsky B, Kaczynski A, Hoffmann W: Ökonomische und gesellschaftliche Herausforderungen der Demenz in Deutschland – Eine Metaanalyse. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 62, 981–992 (2019)
12. Ready RE, Ott BR: Quality of Life measures for dementia. *Health Qual Life Outcomes* 1, 11 (2003)
13. Banerjee S, Smith SC, Lamping DL, Harwood RH, Foley B, Smith P, Murray J, Prince M, Levin E, Mann A, Knapp M: Quality of life in dementia: more than just cognition. An analysis of associations with quality of life in dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77, 146–148 (2006)
14. Partridge L, Fuentealba M, Kennedy BK: The quest to slow ageing through drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 19, 513–532 (2020)

15. Sagar NA, Tarafdar S, Agarwal S, Tarafdar A, Sharma S: Polyamines: Functions, Metabolism, and Role in Human Disease Management. *Med Sci* 9, 44 (2021)
16. Madeo F, Carmona-Gutierrez D, Kepp O, Kroemer G: Spermidine delays aging in humans. *Aging* 10, 2209–2211 (2018)
17. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G: The Hallmarks of Aging. *Cell* 153, 1194–1217 (2013)
18. Cutler RG, Mattson MP: Introduction: The adversities of aging. *Ageing Res Rev* 5, 221–238 (2006)
19. Madeo F, Eisenberg T, Pietrocola F, Kroemer G: Spermidine in health and disease. *Science* 359, eaan2788 (2018)
20. Pegg AE: Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* 61, 880–894 (2009)
21. Igarashi K, Kashiwagi K: Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 39–51 (2010)
22. Kahana C, Nathans D: Translational regulation of mammalian ornithine decarboxylase by polyamines. *J Biol Chem* 260, 15390–15393 (1985)
23. Uemura T, Stringer DE, Blohm-Mangone KA, Gerner EW: Polyamine transport is mediated by both endocytic and solute carrier transport mechanisms in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 299, G517–G522 (2010)
24. Wang C, Delcros J-G, Cannon L, Konate F, Carias H, Biggerstaff J, Gardner RA, Phanstiel: Defining the Molecular Requirements for the Selective Delivery of Polyamine Conjugates into Cells Containing Active Polyamine Transporters. *J Med Chem* 46, 5129–5138 (2003)
25. Soda K, Kano Y, Sakuragi M, Takao K, Lefor A, Konishi F: Long-Term Oral Polyamine Intake Increases Blood Polyamine Concentrations. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 55, 361–366 (2009)
26. Milovic V: Polyamines in the gut lumen: bioavailability and biodistribution. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13, 1021–1025 (2001)
27. Pegg AE: Toxicity of Polyamines and Their Metabolic Products. *Chem Res Toxicol* 26, 1782–1800 (2013)
28. Schuster I, Bernhardt R: Interactions of natural polyamines with mammalian proteins. 2, 79–94 (2011)
29. Lee C-Y, Su G-C, Huang W-Y, Ko M-Y, Yeh H-Y, Chang G-D, Lin S-J, Chi P: Promotion of homology-directed DNA repair by polyamines. *Nat Commun* 10, 65 (2019)
30. Yoshida M, Kashiwagi K, Shigemasa A, Taniguchi S, Yamamoto K, Makinoshima H, Ishihama A, Igarashi K: A Unifying Model for the Role of Polyamines in Bacterial Cell Growth, the Polyamine Modulon. *J Biol Chem* 279, 46008–46013 (2004)

31. Igarashi K, Kashiwagi K: Polyamine Modulon in *Escherichia coli*: Genes Involved in the Stimulation of Cell Growth by Polyamines. *J Biochem (Tokyo)* 139, 11–16 (2006)
32. Uemura T, Higashi K, Takigawa M, Toida T, Kashiwagi K, Igarashi K: Polyamine modulon in yeast—Stimulation of COX4 synthesis by spermidine at the level of translation. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 2538–2545 (2009)
33. Park MH, Cooper HL, Folk JE: Identification of hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor. *Proc Natl Acad Sci* 78, 2869–2873 (1981)
34. Saini P, Eyler DE, Green R, Dever TE: Hypusine-containing Protein eIF5A Promotes Translation Elongation. *Nature* 459, 118–121 (2009)
35. Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG: Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 372, 366–369 (1994)
36. Williams K: Modulation and Block of Ion Channels: A New Biology of Polyamines. *Cell Signal* 9, 1–13 (1997)
37. Childs AC, Mehta DJ, Gerner EW: Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol Life Sci CMLS* 60, 1394–1406 (2003)
38. Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F: Polyamines in aging and disease. *Aging* 3, 716–732 (2011)
39. M L, Mg C, S L, V G, B D, A DL: Prognostic value of tissue polyamine levels in human colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 22, (2002)
40. Casero RA, Murray Stewart T, Pegg AE: Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer* 18, 681–695 (2018)
41. Agostinelli E, Marques MPM, Calheiros R, Gil FPSC, Tempera G, Viceconte N, Battaglia V, Grancara S, Toninello A: Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids* 38, 393–403 (2010)
42. Holbert CE, Cullen MT, Casero RA, Stewart TM: Polyamines in cancer: integrating organismal metabolism and antitumour immunity. *Nat Rev Cancer* 22, 467–480 (2022)
43. Gilad GM, Gilad VH, Wyatt RJ: Accumulation of exogenous polyamines in gerbil brain after ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 18, 197–210 (1993)
44. Shin TH, Lee DY, Basith S, Manavalan B, Paik MJ, Rybinnik I, Mouradian MM, Ahn JH, Lee G: Metabolome Changes in Cerebral Ischemia. *Cells* 9, 1630 (2020)
45. Bell MR, Belarde JA, Johnson HF, Aizenman CD: A neuroprotective role for polyamines in a *Xenopus* tadpole model of epilepsy. *Nat Neurosci* 14, 505–512 (2011)

46. Ozden A, Angelos H, Feyza A, Elizabeth W, John P: Altered plasma levels of arginine metabolites in depression. *J Psychiatr Res* 120, 21–28 (2020)
47. Fiori LM, Turecki G: Implication of the polyamine system in mental disorders. *J Psychiatry Neurosci JPN* 33, 102–110 (2008)
48. Huang Y, Higginson DS, Hester L, Park MH, Snyder SH: Neuronal growth and survival mediated by eIF5A, a polyamine-modified translation initiation factor. *Proc Natl Acad Sci* 104, 4194–4199 (2007)
49. Morrison LD, Becker L, Ang LC, Kish SJ: Polyamines in Human Brain: Regional Distribution and Influence of Aging. *J Neurochem* 65, 636–642 (2002)
50. Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Büttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E, Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breitenbach M, Grubeck-Loebenstern B, Herker E, Fahrenkrog B, Fröhlich K-U, Sinner F, Tavernarakis N, Minois N, Kroemer G, Madeo F: Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 11, 1305–1314 (2009)
51. Kiechl S, Pechlaner R, Willeit P, Notdurfter M, Paulweber B, Willeit K, Werner P, Ruckenstuhl C, Iglseder B, Weger S, Mairhofer B, Gartner M, Kedenko L, Chmelikova M, Stekovic S, Stuppner H, Oberhollenzer F, Kroemer G, Mayr M, Eisenberg T, Tilg H, Madeo F, Willeit J: Higher spermidine intake is linked to lower mortality: a prospective population-based study. *Am J Clin Nutr* 108, 371–380 (2018)
52. Schroeder S, Hofer SJ, Zimmermann A, Pechlaner R, Dammbroeck C, Pendl T, Marcello GM, Pogatschnigg V, Bergmann M, Müller M, Gschiel V, Ristic S, Tadic J, Iwata K, Richter G, Farzi A, Üçal M, Schäfer U, Poglitsch M, Royer P, Mekis R, Agreiter M, Tölle RC, Sótonyi P, Willeit J, Mairhofer B, Niederkofler H, Pallhuber I, Rungger G, Tilg H, Defrancesco M, Marksteiner J, Sinner F, Magnes C, Pieber TR, Holzer P, Kroemer G, Carmona-Gutierrez D, Scorrano L, Dengjel J, Madl T, Sedej S, Sigrist SJ, Rácz B, Kiechl S, Eisenberg T, Madeo F: Dietary spermidine improves cognitive function. *Cell Rep* 35, 108985 (2021)
53. Eisenberg T, Abdellatif M, Schroeder S, Primessnig U, Stekovic S, Pendl T, Harger A, Schipke J, Zimmermann A, Schmidt A, Tong M, Ruckenstuhl C, Dammbroeck C, Gross AS, Herbst V, Magnes C, Trausinger G, Narath S, Meinitzer A, Hu Z, Kirsch A, Eller K, Carmona-Gutierrez D, Büttner S, Pietrocola F, Knittelfelder O, Schrepfer E, Rockenfeller P, Simonini C, Rahn A, Horsch M, Moreth K, Beckers J, Fuchs H, Gailus-Durner V, Neff F, Janik D, Rathkolb B, Rozman J, de Angelis MH, Moustafa T, Haemmerle G, Mayr M, Willeit P, von Frieling-Salewsky M, Pieske B, Scorrano L, Pieber T, Pechlaner R, Willeit J, Sigrist SJ, Linke WA, Mühlfeld C, Sadoshima J, Dengjel J, Kiechl S, Kroemer G, Sedej S, Madeo F: Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat Med* 22, 1428–1438 (2016)
54. Wu H, Wang J, Jiang H, Liu X, Sun X, Chen Y, Hu C, Wang Z, Han T, Sun C, Wei W, Jiang W: The association of dietary spermidine with all-cause mortality and CVD mortality: The U.S. National Health and Nutrition Examination Survey, 2003 to 2014. *Front Public Health* 10, (2022)
55. Moinard C, Cynober L, de Bandt J-P: Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr* 24, 184–197 (2005)

56. Schwarz C, Stekovic S, Wirth M, Benson G, Royer P, Sigrist SJ, Pieber T, Dammbrueck C, Magnes C, Eisenberg T, Pendl T, Bohlken J, Köbe T, Madeo F, Flöel A: Safety and tolerability of spermidine supplementation in mice and older adults with subjective cognitive decline. *Aging* 10, 19–33 (2018)
57. Gupta VK, Scheunemann L, Eisenberg T, Mertel S, Bhukel A, Koemans TS, Kramer JM, Liu KSY, Schroeder S, Stunnenberg HG, Sinner F, Magnes C, Pieber TR, Dipt S, Fiala A, Schenck A, Schwaerzel M, Madeo F, Sigrist SJ: Restoring polyamines protects from age-induced memory impairment in an autophagy-dependent manner. *Nat Neurosci* 16, 1453–1460 (2013)
58. Büttner S, Broeskamp F, Sommer C, Markaki M, Habernig L, Alavian-Ghavanini A, Carmona-Gutierrez D, Eisenberg T, Michael E, Kroemer G, Tavernarakis N, Sigrist SJ, Madeo F: Spermidine protects against  $\alpha$ -synuclein neurotoxicity. *Cell Cycle* 13, 3903–3908 (2014)
59. Schwarz C, Horn N, Benson G, Wrachtrup Calzado I, Wurdack K, Pechlaner R, Grittner U, Wirth M, Flöel A: Spermidine intake is associated with cortical thickness and hippocampal volume in older adults. *NeuroImage* 221, 117132 (2020)
60. Gupta VK, Pech U, Bhukel A, Fulterer A, Ender A, Mauermann SF, Andlauer TFM, Antwi-Adjei E, Beuschel C, Thriene K, Maglione M, Quentin C, Bushow R, Schwärzel M, Mielke T, Madeo F, Dengjel J, Fiala A, Sigrist SJ: Spermidine Suppresses Age-Associated Memory Impairment by Preventing Adverse Increase of Presynaptic Active Zone Size and Release. *PLoS Biol* 14, e1002563 (2016)
61. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW: Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 579–593 (2018)
62. Ohsumi Y: Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res* 24, 9–23 (2014)
63. Stavoe AKH, Holzbaur ELF: Autophagy in Neurons. *Annu Rev Cell Dev Biol* 35, 477–500 (2019)
64. Fleming A, Bourdenx M, Fujimaki M, Karabiyik C, Krause GJ, Lopez A, Martín-Segura A, Puri C, Scrivo A, Skidmore J, Son SM, Stamatakou E, Wrobel L, Zhu Y, Cuervo AM, Rubinsztein DC: The different autophagy degradation pathways and neurodegeneration. *Neuron* 110, 935–966 (2022)
65. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K: Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880–884 (2006)
66. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N: Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889 (2006)
67. Simonsen A, Cumming RC, Brech A, Isakson P, Schubert DR, Finley KD: Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy* 4, 176–184 (2008)

68. Pietrocola F, Lachkar S, Enot DP, Niso-Santano M, Bravo-San Pedro JM, Sica V, Izzo V, Maiuri MC, Madeo F, Mariño G, Kroemer G: Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300. *Cell Death Differ* 22, 509–516 (2015)
69. Mariño G, Pietrocola F, Eisenberg T, Kong Y, Malik SA, Andryushkova A, Schroeder S, Pendl T, Harger A, Niso-Santano M, Zamzami N, Scoazec M, Durand S, Enot DP, Fernández ÁF, Martins I, Kepp O, Senovilla L, Bauvy C, Morselli E, Vacchelli E, Bennetzen M, Magnes C, Sinner F, Pieber T, López-Otín C, Maiuri MC, Codogno P, Andersen JS, Hill JA, Madeo F, Kroemer G: Regulation of Autophagy by Cytosolic Acetyl-Coenzyme A. *Mol Cell* 53, 710–725 (2014)
70. Williams K, Dawson VL, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB: Characterization of polyamines having agonist, antagonist, and inverse agonist effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor. *Neuron* 5, 199–208 (1990)
71. Mony L, Zhu S, Carvalho S, Paoletti P: Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO J* 30, 3134–3146 (2011)
72. Zhuo M: Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. *Mol Brain* 2, 4 (2009)
73. Bliss TVP, Collingridge GL, Kaang B-K, Zhuo M: Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 17, 485–496 (2016)
74. Minois N: Molecular Basis of the ‘Anti-Aging’ Effect of Spermidine and Other Natural Polyamines - A Mini-Review. *Gerontology* 60, 319–326 (2014)
75. Nishimura K, Shiina R, Kashiwagi K, Igarashi K: Decrease in Polyamines with Aging and Their Ingestion from Food and Drink. *J Biochem (Tokyo)* 139, 81–90 (2006)
76. Liu P, Gupta N, Jing Y, Zhang H: Age-related changes in polyamines in memory-associated brain structures in rats. *Neuroscience* 155, 789–796 (2008)
77. Morrison LD, Cao X-C, Kish SJ: Ornithine Decarboxylase in Human Brain: Influence of Aging, Regional Distribution, and Alzheimer’s Disease. *J Neurochem* 71, 288–294 (1998)
78. Madeo F, Bauer MA, Carmona-Gutierrez D, Kroemer G: Spermidine: a physiological autophagy inducer acting as an anti-aging vitamin in humans? *Autophagy* 15, 165–168 (2019)
79. Wirth M, Schwarz C, Benson G, Horn N, Buchert R, Lange C, Köbe T, Hetzer S, Maglione M, Michael E, Märschenz S, Mai K, Kopp U, Schmitz D, Grittner U, Sigrist SJ, Stekovic S, Madeo F, Flöel A: Effects of spermidine supplementation on cognition and biomarkers in older adults with subjective cognitive decline (SmartAge)—study protocol for a randomized controlled trial. *Alzheimers Res Ther* 11, 36 (2019)
80. Schwarz C, Benson GS, Horn N, Wurdack K, Grittner U, Schilling R, Märschenz S, Köbe T, Hofer SJ, Magnes C, Stekovic S, Eisenberg T, Sigrist SJ, Schmitz D, Wirth M, Madeo F, Flöel A: Effects of Spermidine Supplementation on Cognition and Biomarkers in Older Adults With Subjective Cognitive Decline: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open* 5, e2213875 (2022)

81. Pekar T, Bruckner K, Pauschenwein-Frantsich S, Gschaider A, Oppliger M, Willesberger J, Ungersbäck P, Wendzel A, Kremer A, Flak W, Wantke F, Jarisch R: The positive effect of spermidine in older adults suffering from dementia. *Wien Klin Wochenschr* 133, 484–491 (2021)
82. Hipp MS, Kasturi P, Hartl FU: The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 421–435 (2019)
83. Morawe T, Hiebel C, Kern A, Behl C: Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 46, 41–54 (2012)
84. Dwyer BE, Fando JL, Wasterlain CG: Rat Brain Protein Synthesis Declines During Postdevelopmental Aging. *J Neurochem* 35, 746–749 (1980)
85. Kodaira M, Nagasawa M, Yamaguchi T, Ikeda H, Minaminaka K, Chowdhury VS, Yasuo S, Furuse M: Aging rather than stress strongly influences amino acid metabolisms in the brain and genital organs of female mice. *Mech Ageing Dev* 162, 72–79 (2017)
86. Park MH: The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J Biochem (Tokyo)* 139, 161–169 (2006)
87. Lassak J, Wilson DN, Jung K: Stall no more at polyproline stretches with the translation elongation factors EF-P and IF-5A. *Mol Microbiol* 99, 219–235 (2016)
88. Gutierrez E, Shin B-S, Woolstenhulme CJ, Kim J-R, Saini P, Buskirk AR, Dever TE: eIF5A Promotes Translation of Polyproline Motifs. *Mol Cell* 51, 35–45 (2013)
89. Pavlov MY, Watts RE, Tan Z, Cornish VW, Ehrenberg M, Forster AC: Slow peptide bond formation by proline and other N-alkylamino acids in translation. *Proc Natl Acad Sci* 106, 50–54 (2009)
90. Pelechano V, Alepuz P: eIF5A facilitates translation termination globally and promotes the elongation of many non polyproline-specific tripeptide sequences. *Nucleic Acids Res* 45, 7326–7338 (2017)
91. Luchessi AD, Cambiaghi TD, Alves AS, Parreiras-E-Silva LT, Britto LRG, Costa-Neto CM, Curi R: Insights on eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in the brain and aging. *Brain Res* 1228, 6–13 (2008)
92. Schuller AP, Wu CC-C, Dever TE, Buskirk AR, Green R: eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. *Mol Cell* 66, 194-205.e5 (2017)
93. Nishimura K, Lee SB, Park JH, Park MH: Essential role of eIF5A-1 and deoxyhypusine synthase in mouse embryonic development. *Amino Acids* 42, 703–710 (2012)
94. Liang Y, Piao C, Beuschel CB, Toppe D, Kollipara L, Bogdanow B, Maglione M, Lützkendorf J, See JCK, Huang S, Conrad TOF, Kintscher U, Madeo F, Liu F, Sickmann A, Sigrist SJ: eIF5A hypusination, boosted by dietary spermidine, protects from premature brain aging and mitochondrial dysfunction. *Cell Rep* 35, 108941 (2021)



95. Hofer SJ, Liang Y, Zimmermann A, Schroeder S, Dengjel J, Kroemer G, Eisenberg T, Sigrist SJ, Madeo F: Spermidine-induced hypusination preserves mitochondrial and cognitive function during aging. *Autophagy* 17, 2037–2039 (2021)
96. Herculano-Houzel S: The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci* 3, (2009)
97. Cajigas IJ, Will T, Schuman EM: Protein homeostasis and synaptic plasticity. *EMBO J* 29, 2746–2752 (2010)
98. Laßek M, Weingarten J, Volkandt W: The synaptic proteome. *Cell Tissue Res* 359, 255–265 (2015)
99. Freeman SH, Kandel R, Cruz L, Rozkalne A, Newell K, Frosch MP, Hedley-Whyte ET, Locascio JJ, Lipsitz LA, Hyman BT: Preservation of neuronal number despite age-related cortical brain atrophy in elderly subjects without Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 1205–1212 (2008)
100. Mostany R, Anstey JE, Crump KL, Maco B, Knott G, Portera-Cailliau C: Altered Synaptic Dynamics during Normal Brain Aging. *J Neurosci* 33, 4094–4104 (2013)
101. Morrison JH, Baxter MG: The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosci* 13, 240–250 (2012)
102. Caroni P, Donato F, Muller D: Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nat Rev Neurosci* 13, 478–490 (2012)
103. Serrano ME, Kim E, Petrinovic MM, Turkheimer F, Cash D: Imaging Synaptic Density: The Next Holy Grail of Neuroscience? *Front Neurosci* 16, (2022)
104. Grillo FW, Song S, Teles-Grilo Ruivo LM, Huang L, Gao G, Knott GW, Maco B, Ferretti V, Thompson D, Little GE, De Paola V: Increased axonal bouton dynamics in the aging mouse cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1514–E1523 (2013)
105. Petralia RS, Mattson MP, Yao PJ: Communication Breakdown: The Impact of Ageing on Synapse Structure. *Ageing Res Rev* 14, 31–42 (2014)
106. Peters A, Sethares C, Luebke JI: Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex. *Neuroscience* 152, 970–981 (2008)
107. Canas PM, Duarte JMN, Rodrigues RJ, Köfalvi A, Cunha RA: Modification upon aging of the density of presynaptic modulation systems in the hippocampus. *Neurobiol Aging* 30, 1877–1884 (2009)
108. VanGuilder HD, Yan H, Farley JA, Sonntag WE, Freeman WM: Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptoproteome. *J Neurochem* 113, 1577–1588 (2010)

109. Glatigny M, Moriceau S, Rivagorda M, Ramos-Brossier M, Nascimbeni AC, Lante F, Shanley MR, Boudarene N, Rousseaud A, Friedman AK, Settembre C, Kuperwasser N, Friedlander G, Buisson A, Morel E, Codogno P, Oury F: Autophagy Is Required for Memory Formation and Reverses Age-Related Memory Decline. *Curr Biol* 29, 435-448.e8 (2019)
110. Hegde AN: Proteolysis, synaptic plasticity and memory. *Neurobiol Learn Mem* 138, 98–110 (2017)
111. Maglione M, Kochlamazashvili G, Eisenberg T, Rácz B, Michael E, Toppe D, Stumpf A, Wirth A, Zeug A, Müller FE, Moreno-Velasquez L, Sammons RP, Hofer SJ, Madeo F, Maritzen T, Maier N, Ponimaskin E, Schmitz D, Haucke V, Sigrist SJ: Spermidine protects from age-related synaptic alterations at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Sci Rep* 9, 19616 (2019)
112. McAllister AK: Cellular and Molecular Mechanisms of Dendrite Growth. *Cereb Cortex* 10, 963–973 (2000)
113. Arikath J: Molecular mechanisms of dendrite morphogenesis. *Front Cell Neurosci* 6, (2012)
114. Buell SJ, Coleman PD: Dendritic Growth in the Aged Human Brain and Failure of Growth in Senile Dementia. *Science* 206, 854–856 (1979)
115. Chu P, Saito H, Abe K: Polyamines promote regeneration of injured axons of cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* 673, 233–241 (1995)
116. Jan Y-N, Jan LY: Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nat Rev Neurosci* 11, 316–328 (2010)
117. Faundes V, Jennings MD, Crilly S, Legraie S, Withers SE, Cuvertino S, Davies SJ, Douglas AGL, Fry AE, Harrison V, Amiel J, Lehalle D, Newman WG, Newkirk P, Ranells J, Splitt M, Cross LA, Saunders CJ, Sullivan BR, Granadillo JL, Gordon CT, Kasher PR, Pavitt GD, Banka S: Impaired eIF5A function causes a Mendelian disorder that is partially rescued in model systems by spermidine. *Nat Commun* 12, 833 (2021)
118. Ganapathi M, Padgett LR, Yamada K, Devinsky O, Willaert R, Person R, Au P-YB, Tagoe J, McDonald M, Karlowicz D, Wolf B, Lee J, Shen Y, Okur V, Deng L, LeDuc CA, Wang J, Hanner A, Mirmira RG, Park MH, Mastracci TL, Chung WK: Recessive Rare Variants in Deoxyhypusine Synthase, an Enzyme Involved in the Synthesis of Hypusine, Are Associated with a Neurodevelopmental Disorder. *Am J Hum Genet* 104, 287–298 (2019)
119. Kar RK, Hanner AS, Starost MF, Springer D, Mastracci TL, Mirmira RG, Park MH: Neuron-specific ablation of eIF5A or deoxyhypusine synthase leads to impairments in growth, viability, neurodevelopment, and cognitive functions in mice. *J Biol Chem* 297, 101333 (2021)
120. Lambeth LS, Smith CA: Short hairpin RNA-mediated gene silencing. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 942, 205–232 (2013)
121. Moore CB, Guthrie EH, Huang MT-H, Taxman DJ: Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 629, 141–158 (2010)

122. Banker G, Goslin K: Developments in neuronal cell culture. *Nature* 336, 185–186 (1988)
123. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D: Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295, 868–872 (2002)
124. Song H, Yang P-C: Construction of shRNA lentiviral vector. *North Am J Med Sci* 2, 598–601 (2010)
125. Dittgen T, Nimmerjahn A, Komai S, Licznarski P, Waters J, Margrie TW, Helmchen F, Denk W, Brecht M, Osten P: Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 101, 18206–18211 (2004)
126. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D: Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15, 871–875 (1997)
127. Heda GD, Kunwar U, Heda RP: A modified protein assay from microgram to low nanogram levels in dilute samples. *Anal Biochem* 445, 67–72 (2014)
128. Laemmli UK: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685 (1970)
129. Towbin H (2009): Blotting from Immobilized pH Gradient Gels: Application to Total Cell Lysates. In: *Protein Blotting and Detection*, Kurien BT and Scofield RH, eds. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 253–258
130. Bayguinov PO, Oakley DM, Shih C-C, Geanon DJ, Joens MS, Fitzpatrick JAJ: Modern Laser Scanning Confocal Microscopy. *Curr Protoc Cytom* 85, e39 (2018)
131. Arshadi C, Günther U, Eddison M, Harrington KIS, Ferreira TA: SNT: a unifying toolbox for quantification of neuronal anatomy. *Nat Methods* 18, 374–377 (2021)
132. Sholl DA: Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87, 387–406.1 (1953)
133. Bird AD, Cuntz H: Dissecting Sholl Analysis into Its Functional Components. *Cell Rep* 27, 3081–3096.e5 (2019)
134. Wang Y, Wang C, Ranefall P, Broussard GJ, Wang Y, Shi G, Lyu B, Wu C-T, Wang Y, Tian L, Yu G: SynQuant: an automatic tool to quantify synapses from microscopy images. *Bioinformatics* 36, 1599–1606 (2020)
135. Curtin F, Schulz P: Multiple correlations and bonferroni's correction. *Biol Psychiatry* 44, 775–777 (1998)
136. Mishra P, Singh U, Pandey CM, Mishra P, Pandey G: Application of Student's t-test, Analysis of Variance, and Covariance. *Ann Card Anaesth* 22, 407–411 (2019)
137. Holmes JR, Berkowitz A: Dendritic orientation and branching distinguish a class of multifunctional turtle spinal interneurons. *Front Neural Circuits* 8, (2014)

138. Bhukel A, Madeo F, Sigrist SJ: Spermidine boosts autophagy to protect from synapse aging. *Autophagy* 13, 444–445 (2017)
139. Wiedenmann B, Franke WW: Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41, 1017–1028 (1985)
140. Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR: Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol* 25, 821–828 (1996)
141. Gutierrez-Mecinas M, Kuehn ED, Abraira VE, Polgár E, Watanabe M, Todd AJ: Immunostaining for Homer reveals the majority of excitatory synapses in laminae I–III of the mouse spinal dorsal horn. *Neuroscience* 329, 171–181 (2016)
142. Tao-Cheng J-H, Thein S, Yang Y, Reese TS, Gallant PE: Homer is concentrated at the postsynaptic density and does not redistribute after acute synaptic stimulation. *Neuroscience* 266, 80–90 (2014)
143. Pyka M, Busse C, Seidenbecher C, Gundelfinger ED, Faissner A: Astrocytes are crucial for survival and maturation of embryonic hippocampal neurons in a neuron-glia cell-insert coculture assay. *Synap N Y N* 65, 41–53 (2011)
144. Geissler M, Gottschling C, Aguado A, Rauch U, Wetzel CH, Hatt H, Faissner A: Primary Hippocampal Neurons, Which Lack Four Crucial Extracellular Matrix Molecules, Display Abnormalities of Synaptic Structure and Function and Severe Deficits in Perineuronal Net Formation. *J Neurosci* 33, 7742–7755 (2013)
145. Lesuisse C, Martin LJ: Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *J Neurobiol* 51, 9–23 (2002)
146. Yang H, Cong R, Na L, Ju G, You S-W: Long-Term Primary Culture of Highly-Pure Rat Embryonic Hippocampal Neurons of Low-Density. *Neurochem Res* 35, 1333–1342 (2010)
147. Petrović A, Ban J, Tomljanović I, Pongrac M, Ivaničić M, Mikašinović S, Mladinic M: Establishment of Long-Term Primary Cortical Neuronal Cultures From Neonatal Opossum *Monodelphis domestica*. *Front Cell Neurosci* 15, 661492 (2021)
148. Robert F, Cloix J-F, Hevor T: Ultrastructural characterization of rat neurons in primary culture. *Neuroscience* 200, 248–260 (2012)
149. Chinta SJ, Woods G, Rane A, Demaria M, Campisi J, Andersen JK: Cellular senescence and the aging brain. *Exp Gerontol* 68, 3–7 (2015)
150. Moreno-Blas D, Gorostieta-Salas E, Pommer-Alba A, Muciño-Hernández G, Gerónimo-Olvera C, Maciel-Barón LA, Konigsberg M, Massieu L, Castro-Obregón S: Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy. *Aging* 11, 6175–6198 (2019)

151. Abele, J: Ageing in a dish - Strategies to rejuvenate neuronal cell cultures and balance protein homeostasis, Dissertation, Otto-von-Guericke-University Magdeburg, (2019), online verfügbar unter: <https://opendata.uni-halle.de//handle/1981185920/14080>, zuletzt geprüft am: 28.03.22
152. Pfrieger FW, Barres BA: Synaptic Efficacy Enhanced by Glial Cells in Vitro. *Science* 277, 1684–1687 (1997)
153. Eroglu C, Barres BA: Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468, 223–231 (2010)
154. Allen NJ, Bennett ML, Foo LC, Wang GX, Chakraborty C, Smith SJ, Barres BA: Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature* 486, 410–414 (2012)
155. Cullen DK, Gilroy ME, Irons HR, Laplaca MC: Synapse-to-neuron ratio is inversely related to neuronal density in mature neuronal cultures. *Brain Res* 1359, 44–55 (2010)
156. Pfisterer U, Khodosevich K: Neuronal survival in the brain: neuron type-specific mechanisms. *Cell Death Dis* 8, e2643 (2017)
157. Fujita R, Yoshida A, Mizuno K, Ueda H: Cell density-dependent death mode switch of cultured cortical neurons under serum-free starvation stress. *Cell Mol Neurobiol* 21, 317–324 (2001)
158. Jorratt P, Ricny J, Leibold C, Ovsepien SV: Endogenous Modulators of NMDA Receptor Control Dendritic Field Expansion of Cortical Neurons. *Mol Neurobiol* [Epub ahead of print], doi: 10.1007/s12035-022-03147-0 (2022)
159. Cohen E, Ivenshitz M, Amor-Baroukh V, Greenberger V, Segal M: Determinants of spontaneous activity in networks of cultured hippocampus. *Brain Res* 1235, 21–30 (2008)
160. Jia LC, Sano M, Lai P-Y, Chan CK: Connectivities and Synchronous Firing in Cortical Neuronal Networks. *Phys Rev Lett* 93, 088101 (2004)
161. Huang Y-T, Chang Y-L, Chen C-C, Lai P-Y, Chan CK: Positive feedback and synchronized bursts in neuronal cultures. *PLOS ONE* 12, e0187276 (2017)
162. Ito D, Tamate H, Nagayama M, Uchida T, Kudoh SN, Gohara K: Minimum neuron density for synchronized bursts in a rat cortical culture on multi-electrode arrays. *Neuroscience* 171, 50–61 (2010)
163. Tsai S-F, Ku N-W, Wang T-F, Yang Y-H, Shih Y-H, Wu S-Y, Lee C-W, Yu M, Yang T-T, Kuo Y-M: Long-Term Moderate Exercise Rescues Age-Related Decline in Hippocampal Neuronal Complexity and Memory. *Gerontology* 64, 551–561 (2018)
164. Müller-Thomsen L, Borgmann D, Morcinek K, Schröder S, Dengler B, Moser N, Neumaier F, Schneider T, Schröder H, Huggenberger S: Consequences of hyperphosphorylated tau on the morphology and excitability of hippocampal neurons in aged tau transgenic mice. *Neurobiol Aging* 93, 109–123 (2020)

165. Hall CM, Moeendarbary E, Sheridan GK: Mechanobiology of the brain in ageing and Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 53, 3851–3878 (2021)
166. Duan H, Wearne SL, Rocher AB, Macedo A, Morrison JH, Hof PR: Age-related Dendritic and Spine Changes in Corticocortically Projecting Neurons in Macaque Monkeys. *Cereb Cortex* 13, 950–961 (2003)
167. Dickstein DL, Weaver CM, Luebke JI, Hof PR: Dendritic spine changes associated with normal aging. *Neuroscience* 251, 21–32 (2013)
168. Cali C, Wawrzyniak M, Becker C, Maco B, Cantoni M, Jorstad A, Nigro B, Grillo F, Paola VD, Fua P, Knott GW: The effects of aging on neuropil structure in mouse somatosensory cortex—A 3D electron microscopy analysis of layer 1. *PLOS ONE* 13, e0198131 (2018)
169. Chen KS, Masliah E, Mallory M, Gage FH: Synaptic loss in cognitively impaired aged rats is ameliorated by chronic human nerve growth factor infusion. *Neuroscience* 68, 19–27 (1995)
170. Scheff SW, Price DA, Sparks DL: Quantitative assessment of possible age-related change in synaptic numbers in the human frontal cortex. *Neurobiol Aging* 22, 355–365 (2001)
171. Buss EW, Corbett NJ, Roberts JG, Ybarra N, Musial TF, Simkin D, Molina-Campos E, Oh K-J, Nielsen LL, Ayala GD, Mullen SA, Farooqi AK, D'Souza GX, Hill CL, Bean LA, Rogalsky AE, Russo ML, Curlik DM, Antion MD, Weiss C, Chetkovich DM, Oh MM, Disterhoft JF, Nicholson DA: Cognitive aging is associated with redistribution of synaptic weights in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* 118, e1921481118 (2021)
172. Koch SC, Nelson A, Hartenstein V: Structural aspects of the aging invertebrate brain. *Cell Tissue Res* 383, 931–947 (2021)
173. Geinisman Y, de Toledo-Morrell L, Morrell F: Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: morphological substrate of memory deficit in aged rats. *Proc Natl Acad Sci* 83, 3027–3031 (1986)
174. Geinisman Y, de Toledo-Morrell L, Morrell F, Persina IS, Rossi M: Age-related loss of axospinous synapses formed by two afferent systems in the rat dentate gyrus as revealed by the unbiased stereological dissector technique. *Hippocampus* 2, 437–444 (1992)
175. Nicholson DA, Yoshida R, Berry RW, Gallagher M, Geinisman Y: Reduction in Size of Perforated Postsynaptic Densities in Hippocampal Axospinous Synapses and Age-Related Spatial Learning Impairments. *J Neurosci* 24, 7648–7653 (2004)
176. Sultana R, Banks WA, Butterfield DA: Decreased levels of PSD95 and two associated proteins and increased levels of Bcl2 and caspase 3 in hippocampus from subjects with amnesic mild cognitive impairment: Insights into their potential roles for loss of synapses and memory, accumulation of A $\beta$ , and neurodegeneration in a prodromal stage of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 88, 469–477 (2010)
177. de Wilde MC, Overk CR, Sijben JW, Masliah E: Meta-analysis of synaptic pathology in Alzheimer's disease reveals selective molecular vesicular machinery vulnerability. *Alzheimers Dement* 12, 633–644 (2016)

178. Masliah E, Mallory M, Hansen L, Richard D, Alford M, Terry R: Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 174, 67–72 (1994)
179. Masuko T, Kusama-Eguchi K, Sakata K, Kusama T, Chaki S, Okuyama S, Williams K, Kashiwagi K, Igarashi K: Polyamine transport, accumulation, and release in brain. *J Neurochem* 84, 610–617 (2003)
180. Hiasa M, Miyaji T, Haruna Y, Takeuchi T, Harada Y, Moriyama S, Yamamoto A, Omote H, Moriyama Y: Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter. *Sci Rep* 4, 6836 (2014)
181. Seiler N: Polyamine Metabolism. *Digestion* 46, 319–330 (1990)
182. Teixeira D, Santaolalia ML, Meneu V, Alonso E: Dietary Arginine Slightly and Variably Affects Tissue Polyamine Levels in Male Swiss Albino Mice. *J Nutr* 132, 3715–3720 (2002)
183. Soda K, Uemura T, Sanayama H, Igarashi K, Fukui T: Polyamine-Rich Diet Elevates Blood Spermine Levels and Inhibits Pro-Inflammatory Status: An Interventional Study. *Med Sci* 9, 22 (2021)
184. Dieterich DC, Hodas JLL, Gouzer G, Shadrin IY, Ngo JT, Triller A, Tirrell DA, Schuman EM: In situ visualization and dynamics of newly synthesized proteins in rat hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 13, 897–905 (2010)
185. Chu P-J, Saito H, Abe K: Polyamines promote neurite elongation of cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Res* 19, 155–160 (1994)
186. Hofer SJ, Simon AK, Bergmann M, Eisenberg T, Kroemer G, Madeo F: Mechanisms of spermidine-induced autophagy and geroprotection. *Nat Aging* 2, 1112–1129 (2022)
187. Clark SG, Graybeal LL, Bhattacharjee S, Thomas C, Bhattacharya S, Cox DN: Basal autophagy is required for promoting dendritic terminal branching in *Drosophila* sensory neurons. *PLOS ONE* 13, e0206743 (2018)
188. Ban B-K, Jun M-H, Ryu H-H, Jang D-J, Ahmad ST, Lee J-A: Autophagy Negatively Regulates Early Axon Growth in Cortical Neurons. *Mol Cell Biol* 33, 3907–3919 (2013)
189. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema K-J, Coppes RP, Engedal N, Mari M, Reggiori F: Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 14, 1435–1455 (2018)
190. Ostroff LE, Watson DJ, Cao G, Parker PH, Smith H, Harris KM: Shifting patterns of polyribosome accumulation at synapses over the course of hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus* 28, 416–430 (2018)
191. Lottes EN, Cox DN: Homeostatic Roles of the Proteostasis Network in Dendrites. *Front Cell Neurosci* 14, (2020)

192. Stein KC, Morales-Polanco F, van der Lienden J, Rainbolt TK, Frydman J: Ageing exacerbates ribosome pausing to disrupt cotranslational proteostasis. *Nature* 601, 637–642 (2022)
193. McAllister AK, Lo DC, Katz LC: Neurotrophins Regulate Dendritic Growth in Developing Visual Codex.
194. Kwon M, Fernández JR, Zegarek GF, Lo SB, Firestein BL: BDNF-Promoted Increases in Proximal Dendrites Occur via CREB-Dependent Transcriptional Regulation of Cypin. *J Neurosci* 31, 9735–9745 (2011)
195. Li Y, Li F, Qin D, Chen H, Wang J, Wang J, Song S, Wang C, Wang Y, Liu S, Gao D, Wang Z-H: The role of brain derived neurotrophic factor in central nervous system. *Front Aging Neurosci* 14, (2022)
196. Terry AV, Kutiyawalla A, Pillai A: Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats. *Physiol Behav* 102, 149–157 (2011)
197. Miranda M, Morici JF, Zanoni MB, Bekinschtein P: Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Front Cell Neurosci* 13, (2019)
198. Budni J, Bellettini-Santos T, Mina F, Garcez ML, Zugno AI: The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer’s disease. *Aging Dis* 6, 331–341 (2015)
199. Signor C, Girardi BA, Lorena Wendel A, Frühauf PKS, Pillat MM, Ulrich H, Mello CF, Rubin MA: Spermidine improves the persistence of reconsolidated fear memory and neural differentiation in vitro: Involvement of BDNF. *Neurobiol Learn Mem* 140, 82–91 (2017)
200. Xu T-T, Li H, Dai Z, Lau GK, Li B-Y, Zhu W-L, Liu X-Q, Liu H-F, Cai W-W, Huang S-Q, Wang Q, Zhang S-J: Spermidine and spermine delay brain aging by inducing autophagy in SAMP8 mice. *Aging* 12, 6401–6414 (2020)
201. Ojo B, Rezaie P, Gabbott PL, Davies H, Colyer F, Cowley TR, Lynch M, Stewart MG: Age-related changes in the hippocampus (loss of synaptophysin and glial–synaptic interaction) are modified by systemic treatment with an NCAM-derived peptide, FGL. *Brain Behav Immun* 26, 778–788 (2012)
202. Hernandez D, Torres CA, Setlik W, Cebrián C, Mosharov EV, Tang G, Cheng H-C, Kholodilov N, Yarygina O, Burke RE, Gershon M, Sulzer D: Regulation of Presynaptic Neurotransmission by Macroautophagy. *Neuron* 74, 277–284 (2012)
203. Harris K, Stevens J: Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 9, 2982–2997 (1989)
204. Gundelfinger ED, Reissner C, Garner CC: Role of Bassoon and Piccolo in Assembly and Molecular Organization of the Active Zone. *Front Synaptic Neurosci* 7, (2016)
205. Bertrand SJ, Aksenova MV, Aksenov MY, Mactutus CF, Booze RM: Endogenous amyloidogenesis in long-term rat hippocampal cell cultures. *BMC Neurosci* 12, 38 (2011)



206. Denker A, Bethani I, Kröhnert K, Körber C, Horstmann H, Wilhelm BG, Barysch SV, Kuner T, Neher E, Rizzoli SO: A small pool of vesicles maintains synaptic activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 108, 17177–17182 (2011)
207. Rizzoli SO: Synaptic vesicle recycling: steps and principles. *EMBO J* 33, 788–822 (2014)
208. Anisimova AS, Alexandrov AI, Makarova NE, Gladyshev VN, Dmitriev SE: Protein synthesis and quality control in aging. *Aging* 10, 4269–4288 (2018)
209. Wolff EC, Kang KR, Kim YS, Park MH: Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. *Amino Acids* 33, 341–350 (2007)
210. Park MH, Nishimura K, Zanelli CF, Valentini SR: Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* 38, 491–500 (2010)
211. Park MH, Cooper HL, Folk JE: The biosynthesis of protein-bound hypusine (N epsilon -(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine). Lysine as the amino acid precursor and the intermediate role of deoxyhypusine (N epsilon -(4-aminobutyl)lysine). *J Biol Chem* 257, 7217–7222 (1982)
212. Park J-H, Aravind L, Wolff EC, Kaevel J, Kim YS, Park MH: Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: A HEAT-repeat-containing metalloenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 51–56 (2006)
213. Park MH, Kar RK, Banka S, Ziegler A, Chung WK: Post-translational formation of hypusine in eIF5A: implications in human neurodevelopment. *Amino Acids* 54, 485–499 (2022)
214. Jenkins ZA, Hååg PG, Johansson HE: Human EIF5A2 on Chromosome 3q25–q27 Is a Phylogenetically Conserved Vertebrate Variant of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A with Tissue-Specific Expression. *Genomics* 71, 101–109 (2001)
215. Clement PMJ, Henderson CA, Jenkins ZA, Smit-McBride Z, Wolff EC, Hershey JWB, Park MH, Johansson HE: Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2. *Eur J Biochem* 270, 4254–4263 (2003)
216. Nishimura K, Murozumi K, Shirahata A, Park MH, Kashiwagi K, Igarashi K: Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation. *Biochem J* 385, 779–785 (2005)
217. Lubas M, Harder LM, Kumsta C, Tiessen I, Hansen M, Andersen JS, Lund AH, Frankel LB: eIF5A is required for autophagy by mediating ATG3 translation. *EMBO Rep* 19, e46072 (2018)
218. Chen M, Gai Z, Okada C, Ye Y, Yu J, Yao M: Flexible NAD<sup>+</sup> Binding in Deoxyhypusine Synthase Reflects the Dynamic Hypusine Modification of Translation Factor IF5A. *Int J Mol Sci* 21, 5509 (2020)
219. Wortha SM, Frenzel S, Bahls M, Habes M, Wittfeld K, Van der Auwera S, Bülow R, Zylla S, Friedrich N, Nauck M, Völzke H, Grabe HJ, Schwarz C, Flöel A: Association of spermidine plasma levels with brain aging in a population-based study. *Alzheimers Dement* alz.12815 (2022)

220. Sternberg Z, Podolsky R, Nir A, Yu J, Nir R, Halvorsen SW, Quinn JF, Kaye J, Kolb C: Elevated spermidine serum levels in mild cognitive impairment, a potential biomarker of progression to Alzheimer dementia, a pilot study. *J Clin Neurosci* 100, 169–174 (2022)
221. Zheng L, Xie Y, Sun Z, Zhang R, Ma Y, Xu J, Zheng J, Xu Q, Li Z, Guo X, Sun G, Xing F, Sun Y, Wen D: Serum Spermidine in Relation to Risk of Stroke: A Multilevel Study. *Front Nutr* 9, (2022)
222. Tofalo R, Cocchi S, Suzzi G: Polyamines and Gut Microbiota. *Front Nutr* 6, (2019)
223. Shin W-W, Fong W-F, Pang S-F, Wong PC-L: Limited Blood-Brain Barrier Transport of Polyamines. *J Neurochem* 44, 1056–1059 (1985)
224. Roberts SB, Silver RE, Das SK, Fielding RA, Gilhooly CH, Jacques PF, Kelly JM, Mason JB, McKeown NM, Reardon MA, Rowan S, Saltzman E, Shukitt-Hale B, Smith CE, Taylor AA, Wu D, Zhang FF, Panetta K, Booth S: Healthy Aging—Nutrition Matters: Start Early and Screen Often. *Adv Nutr* 12, 1438–1448 (2021)
225. Barha CK, Davis JC, Falck RS, Nagamatsu LS, Liu-Ambrose T: Sex differences in exercise efficacy to improve cognition: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials in older humans. *Front Neuroendocrinol* 46, 71–85 (2017)
226. Nuzum H, Stickel A, Corona M, Zeller M, Melrose RJ, Wilkins SS: Potential Benefits of Physical Activity in MCI and Dementia. *Behav Neurol* 2020, e7807856 (2020)
227. McEwen SC, Siddarth P, Abedelsater B, Kim Y, Mui W, Wu P, Emerson ND, Lee J, Greenberg S, Shelton T, Kaiser S, Small GW, Merrill DA: Simultaneous Aerobic Exercise and Memory Training Program in Older Adults with Subjective Memory Impairments. *J Alzheimers Dis* 62, 795–806 (2018)
228. López-Higes R, Martín-Aragoneses MT, Rubio-Valdehita S, Delgado-Losada ML, Montejo P, Montenegro M, Prados JM, de Frutos-Lucas J, López-Sanz D: Efficacy of Cognitive Training in Older Adults with and without Subjective Cognitive Decline Is Associated with Inhibition Efficiency and Working Memory Span, Not with Cognitive Reserve. *Front Aging Neurosci* 10, (2018)
229. Li S, Hagan K, Grodstein F, VanderWeele TJ: Social integration and healthy aging among U.S. women. *Prev Med Rep* 9, 144–148 (2018)
230. Toyama M, Fuller HR, Owino J: Longitudinal Implications of Social Integration for Age and Gender Differences in Late-Life Physical Functioning. *Int J Aging Hum Dev* 94, 169–192 (2022)
231. Lingor P, Michel U, Schöll U, Bähr M, Kügler S: Transfection of “naked” siRNA results in endosomal uptake and metabolic impairment in cultured neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 1126–1133 (2004)

## 7 Danksagung

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## 8 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Der Effekt Spermidins und der Hypusinierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 5A auf die Plastizität kortikaler Primärkulturen der Ratte“**

Im Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter der Betreuung von

**Frau Prof. Dr. rer. nat. Daniela C. Dieterich**

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und zur Unterstützung keine sonstigen als die in der Arbeit aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

In dieser Arbeit sind keine Rechte Dritter verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation an keiner weiteren Hochschule im In- und Ausland zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen oder zu vertreiben.

Magdeburg, den 17.04.2023

Anna Raffauf

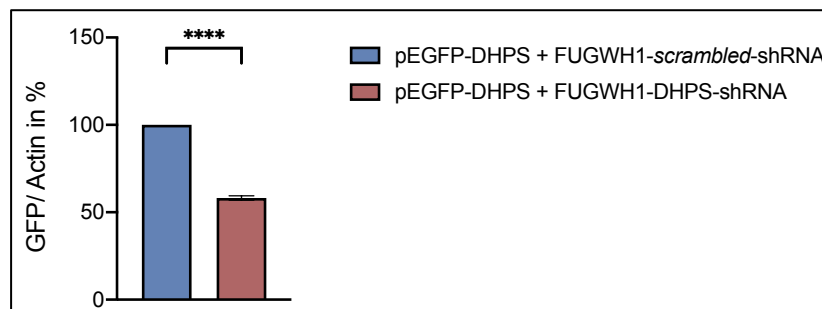
## 9 Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

# 10Anlagen

## 10.1 Prüfung der Effektivität des DHPS-*knock-downs* in HEK293T-Zellen

Die Vektoren wurden in HEK293T-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Methode transfiziert und ein Immunoblot durchgeführt. Der Erfolg der Transfektion wurde anhand des Fluoreszenzsignals bestimmt, das von dem durch die verwendeten Vektoren kodierten GFP ausgesendet wurde. Anschließend wurde die Effektivität des *knock-downs* in HEK293T-Zellen getestet. Dafür wurde ein weiteres DHPS-Überexpressionskonstrukt in einem pEGFP-N3-Vektor erstellt und dieser jeweils mit dem FUGWH1-DHPS-shRNA (*knock-down*) und dem FUGWH1-*scrambled*-shRNA (Kontrolle) transfiziert [231]. Die Signalintensität des GFP nahm in den HEK293T-Zellen, welche das DHPS-*knock-down*-Konstrukt enthielten durchschnittlich um 41,8 % ab. Somit wurde die transfizierte DHPS-RNA, durch das DHPS-*knock-down*-Konstrukt um fast 42 % reduziert. Es kann davon ausgegangen werden, dass die gemessenen Werte die nicht die vollständige Wirkung des *knock-down*-Konstruktes widerspiegeln. Darüber hinaus wurde vermutlich auch die endogene DHPS-Konzentration vermindert, welche jedoch nicht durch das GFP Signal dargestellt werden kann.



**Abbildung 10.1: Effektivität des DHPS-*knock-downs***

Die Plasmide FUGW-DHPS, FUGWH1-*scrambled*-shRNA und FUGWH1-DHPS-shRNA wurden in HEK293T-Zellen transfiziert. Die Konzentration der Kontrollgruppe (pEGFP-DHPS + FUGWH1-DHPS-shRNA) wurde auf 100 normiert. Die HEK293T-Zellen, welchen das *knock-down*-Konstrukt FUGWH1-DHPS-shRNA transfiziert wurde, wiesen ein signifikant reduziertes GFP-Signal auf. Für die statistische Analyse wurde ein ungepaarter t-Test nach Student verwendet (Es wurden drei biologische Replikate mit jeweils 2-3 technischen Replikaten durchgeführt).