

Aus dem Institut für Anatomie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## **DISSERTATION**

Die Verteilung von Spermidinsynthese im Rattenhirn

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Krauß

aus Hennigsdorf

Gutachter:     1. Prof. Dr. R. W. Veh  
                  2. Prof. Dr. med. A. Reichenbach  
                  3. Prof. Dr. M. Engelmann

**Datum der Promotion:** 8. Dezember 2008

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	2
2. Einleitung .....	3
3. Material und Methoden.....	4
4. Ergebnisse .....	5
5. Diskussion.....	9
6. Literaturverzeichnis .....	12
7. Curriculum vitae .....	19
8. Publikationsliste .....	20
9. Anteilserklärung.....	21
10. Eidesstattliche Erklärung .....	22
11. Danksagung.....	23

## **1. Zusammenfassung**

Die ubiquitären Polyamine Spermidin und Spermin können im Gehirn die Erregbarkeit von Neuronen und Gliazellen beeinflussen, indem sie unter anderem mit einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen und verschiedenen Glutamatrezeptoren interagieren. Spermidin und Spermin sind immunologisch nicht unterscheidbar und wurden in Astrozyten sowie einigen Typen von Neuronen nachgewiesen. Eine Umverteilung von Spermidin und Spermin nach ihrer Synthese ist möglich und gilt nach dem derzeitigen Kenntnisstand als wahrscheinlich. Das Wissen um die Lokalisation der Polyaminsyntheseenzyme könnte einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis physiologischer und pathophysiologischer Zusammenhänge liefern, an denen Spermidin und Spermin beteiligt sind. Zur Untersuchung der Spermidinsyntheseverteilung wurde polyklonales Anti-Spermidinsynthase-Serum gereinigt und biochemisch charakterisiert. Der so gewonnene, monospezifische Antikörper markierte im Western Blot rekombinante Spermidinsynthase sowie das native Protein in der Prostata und dem Hypothalamus. Als Positivkontrolle für die immunzytochemischen Analysen diente Prostatagewebe, das für seinen hohen Polyamingehalt bekannt ist. Im Gehirn der Ratte zeigte sich eine sehr heterogene, vorwiegend neuronale Spermidinsynthaseexpression. Zusätzlich war das Enzym aber auch im Neuropil verschiedener Areale deutlich nachweisbar. Neben den paraventriculären und supraoptischen Hypothalamuskernen, für die bereits zuvor ein hoher Polyamingehalt beschrieben worden war, konnten weitere Areale mit Spermidinsynthaseexpression identifiziert werden. Hierzu zählen das Striatum, der Nucleus accumbens, die Lamina I des zerebralen Kortex sowie der zerebelläre Kortex. Das Expressionsmuster der Spermidinsynthase im Nucleus accumbens scheint auf eine dem Striatum analoge „Patch-Matrix“-Organisation hinzudeuten. Im Kleinhirn haben sich, neben einer ausgeprägten synaptischen Spermidinsyntheselokalisation, auch deutliche Anhaltspunkte für eine funktionelle Bedeutung von Spermidin in diesem Areal ergeben.

## **2. Einleitung**

Die ubiquitären Polyamine Putrescin (Put), Spermidin (Spd) und Spermin (Spm) sind kleine organische Polykationen, die für basale Zellfunktionen wie Zellteilung, Proliferation und Differenzierung von essentieller Bedeutung sind (Bachrach et al. 2001; Igarashi et al. 2000; Pegg et al. 1982; Tabor et al. 1984). Im Zentralnervensystem beeinflussen Spd und Spm unter anderem die Funktion von Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ (Benveniste et al. 1993), AMPA/Kainat-Typ (Bowie et al. 1995; Donevan et al. 1995; Isa et al. 1995; Kamboj et al. 1995; Koh et al. 1995) sowie einwärtsgerichteter Kaliumkanäle (Kir-Kanäle) (Fakler et al. 1994; Fakler et al. 1995; Ficker et al. 1994; Lopatin et al. 1994; Lopatin et al. 1995). Trotz ihres ubiquitären Vorkommens sind Polyamine im Rattenhirn nicht gleichförmig verteilt, sondern kommen lokal angereichert vor (Fujiwara et al. 1997; Laube et al. 2002; Laube et al. 1997). Deutliche Immunmarkierungen wurden in Astrocyten, einigen Neuronenpopulationen sowie einigen Neuropilarealen beobachtet. Von den acht an der Polyaminbiosynthese beteiligten Enzymen ist im Rattenhirn bisher nur die Ornithindecarboxylase (ODC) immunzytochemisch charakterisiert und in verschiedenen Neuronenpopulationen lokalisiert worden (Bernstein et al. 1999; Cintra et al. 1987; Junttila et al. 1993). Die ODC katalysiert die Decarboxylierung von Ornithin zu Put. Die fehlende ODC-Immunreaktivität in Spd/Spm-haltigen Astrozyten wurde als Hinweis auf Synthese- und Transportvorgänge zwischen Neuronen und Gliazellen interpretiert (Laube et al. 1997). Den Astrozyten würde demnach eine Speicherfunktion zukommen, während die Synthese primär in Neuronen stattfinden könnte. Da Transportvorgänge für Polyamine beschrieben wurden (Harman et al. 1981; Masuko et al. 2003; Sakata et al. 2000; Seiler et al. 1996), muss davon ausgegangen werden, dass die Lokalisation der Polyamine selbst nicht notwendigerweise Rückschlüsse auf den zellulären Ursprung ihrer Synthese im Gehirn erlaubt. Demgegenüber verspricht die Lokalisation der Synthesenzyme Aufschlüsse über die funktionelle Relevanz lokaler Polyaminsynthese im Gehirn.

**Zielstellung:** Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Reinigung und Charakterisierung eines Antiserums gegen Spermidinsynthase (SpdS) sowie die Verwendung des gereinigten Antikörpers zur immunzytochemischen Charakterisierung des Expressionsmusters der Spermidinsynthase im Rattengehirn.

### **3. Material und Methoden**

Die für die Anfertigung der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden (Krauss et al. 2006; Krauss et al. 2007) werden im folgenden kurz zusammengefasst. Für die Immunisierung wurde bakteriell exprimiertes Fusionsprotein verwendet. Die Aufreinigung des anti-SpdS-Rohserums erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurden zur Entfernung unerwünschter Kreuzreaktivitäten Nitrozellulosemembranen mit einem vergleichbar hergestellten Fusionsprotein (Sperminsynthase) beladen und mit dem Rohserum inkubiert. Weitere Kreuzreaktivitäten gegen bakterielle Proteine wurden anschliessend durch einen Inkubationsschritt mit Bakterienpelletts (Pompeia et al. 1996) eliminiert. Schließlich erfolgte die Affinitätsreinigung des verbliebenen Überstandes an mit SpdS-Fusionsprotein beladenen Nitrozellulosemembranen. Die eluierten und dialysierten Antikörper wurden über SP-Sepharose-Säulen eingeeengt und die relevanten Fraktionen vereinigt. Die Aktivität des so gewonnenen anti-SpdS-Antikörpers wurde mittels indirektem und kompetitivem ELISA bestimmt (Krauss et al. 2006). Für die anschließend durchgeführten Western Blot-Experimente wurden jeweils vier Rattengehirne und Prostatae in Gegenwart von Proteinaseinhibitoren homogenisiert, zentrifugiert und die Proteinkonzentration der Überstände mittels Bicinchoninsäuretest (Smith et al. 1985) bestimmt. Nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Gradientengelen erfolgte der Transfer der Gele auf Nitrocellulosemembranen, die mit dem Primärantikörper über Nacht in fünf Prozent Magermilchpulver in TBS, pH 7,4 inkubiert wurden. Zur Visualisierung wurde alkalische Phosphatasegekoppelter Zweitantikörper verwendet. Neben dem zu charakterisierenden anti-SpdS-Antikörper wurden zahlreiche weitere Primär- und Sekundärantikörper verwendet und detailliert aufgelistet. Die am Rattengehirn erhobenen Daten basieren auf 1128 Frontalschnitten von siebzehn Tieren. Von zwei Gehirnen wurden lückenlos Frontalschnittserien zwischen dem Bulbus olfactorius und dem Rückenmark angefertigt und alternierend mit Antikörpern gegen SpdS, Spermidin/Spermin, neuronale Stickoxidsynthase sowie mit Kresylviolett zur morphologischen Orientierung gefärbt. Für die Quantifizierung SpdS-positiver Neurone sowie verschiedener Interneuronenmarker im Striatum wurden zusätzliche Serien von Frontalschnitten zwischen dem caudalen Abschnitt des Nucleus accumbens und dem Hypophysenstiel angefertigt. Frei flottierende Kryostatschnitte wurden einem standardisierten Behandlungsschema unterzogen. Als Spezifitätskontrolle wurde der SpdS-Antikörper mit seinem korrespondierenden Antigen (10 mg/ml) für eine Stunde bei 37°C vorinkubiert. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden auf ähnliche Weise durchgeführt wie die Immunoperoxidasemarkerungen. Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Schnitte gewaschen, aufgezogen, kurz in reinem Alkohol und Xylol geschwenkt und in DPX eingebettet.

#### **4. Ergebnisse**

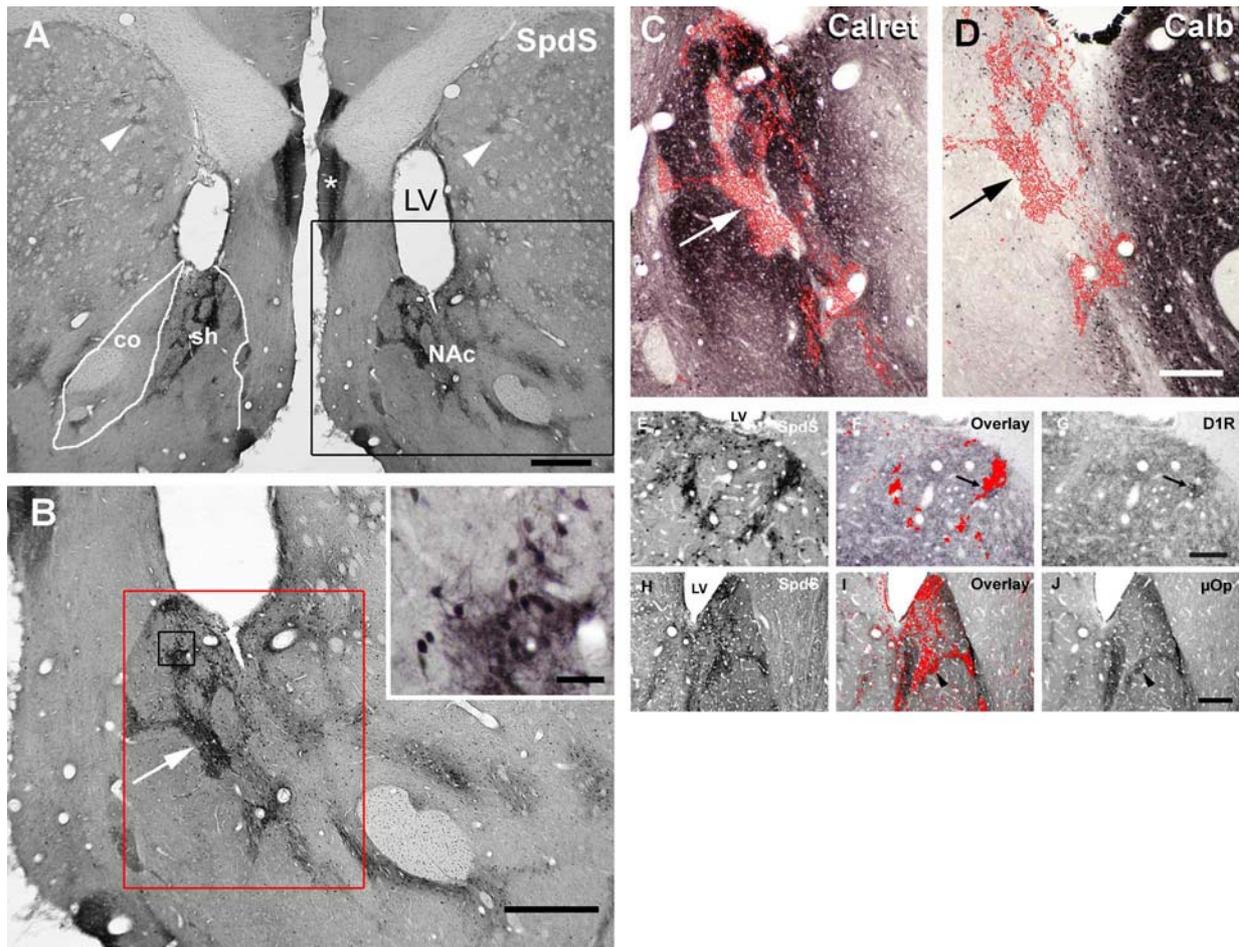
Die zur Immunisierung benutzte Gesamtsequenz der Maus-Spermidinsynthese weist auf Aminosäureebene lediglich eine Homologie von 28,5 Prozent zum nächst verwandten Protein, der Maus-Sperminsynthese, auf. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass sich die beiden Proteine immunologisch diskriminieren lassen. Die Überprüfung der Spezifität des gereinigten Antikörpers mittels kompetitivem ELISA (s. Krauss et al. 2006, Abbildung 1) ergab keine Kreuzreaktivität mit gereinigtem Sperminsynthese-Fusionsprotein. Die Aktivität gegen SpdS dagegen fiel mit steigender Konzentration des kompetitiv eingesetzten Spd-Fusionsproteins sigmoidal ab und konnte vollständig unterdrückt werden. Im Western Blot an SpdS-exprimierenden Bakterienlysaten zeigte sich eine kräftige Bande mit dem Molekulargewicht der SpdS von 35 kDa. Als weitere Positivkontrolle eigneten sich besonders polyaminreiche, peptid- und proteinsezernierende Zellen bzw. Gewebe (Tabor et al. 1964), wie die Prostata (Hougaard 1992) und der Hypothalamus (Fujiwara et al. 1997; Laube et al. 2002). In beiden Fällen konnten im Western Blot Banden mit dem Molekulargewicht der SpdS detektiert werden. Ebenso wie im ELISA zeigte sich im Western Blot an Gewebehomogenaten keine Kreuzreaktivität gegen Sperminsynthese. Der biochemisch charakterisierte Antikörper wurde zur weiteren Verwendung in der Immunzytochemie zunächst zu Kontrollzwecken wiederum an der Prostata sowie den neurosekretorischen Kernen (Nucleus supraopticus, Nucleus paraventricularis) des Hypothalamus überprüft und zeigte in beiden Fällen eine kräftige Immunreaktivität. Schließlich konnte auch in SpdS-transfizierten CHO-Zellen das Protein immunzytochemisch nachgewiesen werden. Zusammenfassend ließen die durchgeführten Untersuchungen zur Spezifität des SpdS-Antikörpers auf seine Verwendbarkeit in biochemischen und immunzytochemischen Anwendungen schließen.

Die Verwendung des SpdS-Antikörpers an Gehirnschnitten der Ratte zeigte im Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis des Hypothalamus eine vergleichbare, kräftige Markierung (s. Krauss et al. 2006, Abbildung 2). Ähnliche Resultate wurden zuvor bereits mit Antikörpern gegen die Polyamine Spermidin/Spermin beobachtet (Fujiwara et al. 1997). Während die beiden genannten Polyamine neben einigen Neuronenpopulationen vorwiegend in Astrocyten lokalisiert wurden (Laube et al. 1997), zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung ein überwiegend neuronales SpdS-Expressionsmuster mit mehreren Schwerpunkten in verschiedenen Hirnarealen. Neben gefärbten Somata war in einigen Regionen, wie z.B. im Striatum, im Induseum griseum und in den zirkumventrikulären Organen eine deutliche Neuropilmarkierung auffällig. Die Neuropilmarkierung im Striatum war eindeutig heterogen und erinnerte an das Verteilungsmuster des neurochemischen Markers  $\mu$ -Opiatrezeptor, der das so

genannte „Patch Compartment“ darstellt. Anhand von SpdS- bzw.  $\mu$ -Opiatrezeptor-gefärbten Parallelschnitten konnte die Deckungsgleichheit der Kompartimente und damit die Befähigung des SpdS-Antikörpers zur Darstellung des „Patch Compartments“ gezeigt werden (s. Krauss et al. 2006, Abbildung 3). Die SpdS-Markierung erstreckte sich auch auf neuronale Zellkörper, die sowohl innerhalb des „Patch Compartments“ als auch in der umgebenden Matrix lokalisiert waren. Zellfortsätze von gefärbten Matrixneuronen verliefen z.T. in Richtung des „Patch Compartments“, das mit der umgebenden Matrix über Interneuronen kommuniziert (Gerfen 1992; Kawaguchi 1997). Die Verteilung und Morphologie der gefärbten Matrixneurone erinnerte an striatale Interneurone. Allerdings konnte mit den Interneuronmarkern Calbindin, Parvalbumin, Calretinin, Präpro-Neuropeptid Y, neuronaler Stickoxidsynthase und Cholinacetyltransferase keine Kolo-kalisation mit SpdS gefunden werden (s. Krauss et al. 2006, Abbildung 6). Die pars compacta der Substantia nigra, die den dopaminergen Eingang für das Striatum liefert, zeigte lediglich eine moderate SpdS-Immunreaktivität. In weiteren Arealen, wie dem Hypothalamus, dem Locus caeruleus und einigen Raphekernen, war dagegen eine starke SpdS-Expression zu beobachten. Auffällig heterogene SpdS-Verteilungsmuster zeigten sich weiterhin im Nucleus accumbens, der Groß- und Kleinhirnrinde, dem Hippokampus und der Amygdala (s. Krauss et al. 2007, Abbildung 1-5). Der Nucleus accumbens (NAc) ist am Belohnungssystem und der Suchtentstehung beteiligt. Er erhält einen kräftigen dopaminergen Eingang aus der ventralen tegmentalen Area (VTA) und wird in ein „Shell“- und „Core“-Kompartiment unterteilt. Im NAc zeigte sich eine dem Striatum vergleichbare, fleckenhafte SpdS-Immunreaktivität in Neuropil und Neuronen (Abb. 1). Allerdings war die Intensität der Markierung im dorsomedialen Teil des „Shell“-Kompartiments deutlich stärker ausgeprägt als im Striatum (Abb. 1A). Um zu untersuchen, ob das SpdS-Expressionsmuster (Abb. 1B) in Beziehung zu neurochemischen Markern für dieses Areal steht, wurden wiederum Parallelschnitte für Calretinin, Calbindin, den D1-Dopaminrezeptor sowie den  $\mu$ -Opiatrezeptor markiert. Calretinin wies zwar ebenfalls eine inhomogene Verteilung im Neuropil des NAc auf (Hiroi 1995), jedoch mit einer im Vergleich zur SpdS-Markierung komplementären Verteilung, d.h. die SpdS-positiven Flecken waren deckungsgleich mit Calretinin-negativen Arealen (Overlay in Abb. 1C). Die Calbindin-positive „Core“-Region dagegen war SpdS-negativ (Overlay in Abb. 1D). D1-Dopaminrezeptoren (Abb. 1G) und  $\mu$ -Opiat-Rezeptoren (Abb. 1J) weisen im dorsomedialen „Shell“-Areal des NAc ebenfalls eine ungleichmäßige Verteilung auf (Jansson et al. 1999; Mansour et al. 1995; Minami et al. 1994). In der Überlagerung mit der SpdS-Markierung (Abb. 1F,I) zeigte sich im Fall des D1-Rezeptors eine Überlappung mit der SpdS-Verteilung (Abb. 1E). Dagegen beschränkte sich die  $\mu$ -Opiatrezeptorexpression (Abb. 1H)

im wesentlichen auf SpdS-freie Areale. In der hippocampalen Formation waren Neuronen und Neuropil des Indusium griseum / Fasciola cinereum besonders auffällig markiert. Im Ammonshorn und Gyrus dentatus dominierte die Immunreaktivität in einer Subpopulation von Interneuronen. Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen mit den Markern Calbindin, Parvalbumin, Calretinin, neuronaler Stickoxidsynthase und Reelin, ein mit Entwicklung und synaptischer Plastizität assoziiertes Protein der extrazellulären Matrix, ergaben eine teilweise Kollokalisierung mit neuronaler Stickoxidsynthase und Reelin im Hippokampus und Gyrus dentatus. Immunreaktivität in Pyramidenzellen war in der CA1-Region, im Gegensatz zur CA3-Region, deutlich ausgeprägt (s. Krauss et al. 2007, Abbildung 1). In der Großhirnrinde zeigte sich eine SpdS-positive Population von Neuronen, vorwiegend in Schicht I und, weniger stark ausgeprägt, auch in Schicht II (s. Krauss et al. 2007, Abbildung 2). Da in Schicht I Reelin-positive Zellen (Cajal-Retzius-Zellen) weit verbreitet sind (Ramos-Moreno et al. 2006), wurden wiederum Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen durchgeführt. Ein Großteil der SpdS-positiven Schicht I-Neurone, ca. neunzig Prozent, war ebenfalls Reelin-positiv. Die SpdS-Immunreaktivität im zerebralen Kortex war zudem deutlich stärker als die der bereits erwähnten striatalen Neurone. Die Kleinhirnrinde war durch deutliche Kontraste in der Immunreaktivität in Molekular- und Körnerzellschicht gekennzeichnet. Während das Neuropil der Molekularschicht diffus gefärbt war, traten in der Körnerzellschicht zahlreiche, ca. drei bis fünf Micrometer große, intensiv gefärbte Strukturen hervor, die aufgrund ihres licht- und elektronenmikroskopischen Erscheinungsbildes als Moosfaserterminalen identifiziert werden konnten (Krauss et al. 2007, Abbildung 4). Im Gegensatz dazu wurde in Körnerzellen keine Immunreaktivität detektiert. Purkinjezellen waren nur schwach positiv. Die präsynaptische Lokalisation der SpdS in Moosfasern gab Anlass, die diffuse Markierung in der Molekularschicht hinsichtlich der synaptischen Feinlokalisierung zu überprüfen. Dabei zeigte sich, dass in Parallel- und Kletterfasern ebenfalls eine präsynaptische Expression zu beobachten war. Allerdings war die SpdS hier nur in einem Teil der Terminalen nachweisbar. In ersten elektrophysiologischen Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Dr. Torsten Weiß ergaben sich Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung für Spermidin in Moosfasersynapsen. Die Applikation von Spermidin bewirkte am akuten „Slice“-Präparat eine dosisabhängige Inhibition elektrischer Feldpotentiale, die durch Reizung der Moosfasereingänge hervorgerufen werden. In der Amygdala beschränkte sich die SpdS-Immunreaktivität auf wenige Kerne, wie den zentrolateralen Kern und die laterale Kerngruppe. Das Neuropil war nur im zentrolateralen Kern deutlich immunopositiv, wohingegen in beiden Arealen deutliche Expression in Neuronen beobachtet wurde. (s. Krauss et al. 2007, Abbildung 5)

## Abbildung



**Abbildung 1:** SpdS-Immunreaktivität im Nucleus accumbens (NAc). A: Übersichtsaufnahme auf Höhe des Genu corpus callosum mit stark SpdS-positiven Arealen im dorsomedialen „Shell Compartment“ (sh) des NAc und der Taenia tecta (Stern). Deutlich zu erkennen ist die im Vergleich zum Striatum (Pfeilköpfe) stärkere SpdS Immunoreaktivität im NAc. Der Rahmen in A markiert das in B vergrößerte Areal. B: Intensiv SpdS-markiertes, fleckenförmiges Neuropil im „Shell Compartment“ (Pfeil) gegenüber deutlich schwächer gefärbtem Neuropil im „Core Compartment“. Sowohl in den immunopositiven Neuropilarealen des „Shell Compartment“ als auch in den umgebenden Arealen finden sich zahlreiche, kräftig gefärbte Neuronen (Inset). Der schwarze Rahmen in B markiert die Position des Insets. Der rote Rahmen in B zeigt die vergrößerten Areale in C und D an. C, D: Falschfarbenüberlagerung von dem in B mit einem Pfeil markierten SpdS-Areal auf Calretinin (Calret)- bzw. Calbindin (Calb)-gefärbten Parallelschnitten. Calretinin-negative Areale decken sich weitgehend mit SpdS-positiven Arealen (rot), die wiederum deutlich außerhalb der Calbindin-positiven Region liegen. E-G: SpdS- und D1-Dopaminrezeptor-gefärbte Parallelschnitte. Das markierte (Pfeil) D1-positive Areal (G) liegt deutlich innerhalb (rot, Überlagerung in F) des SpdS-Areals (E). H-J: SpdS- und  $\mu$ -Opiatrezeptor-gefärbte Parallelschnitte. Abgesehen von dem markierten (Pfeilkopf), bogenförmigen Areal (I,J), ist keine Überlappung zwischen den SpdS- (H) und  $\mu$ -Opiatrezeptor-Arealen (J) zu erkennen (rot, Überlagerung in I). co = Core-Areal, LV = Lateraler Ventrikel, sh = Shell-Areal. Die Ausrichtung der rot überlagerten SpdS-Markierung erfolgte anhand der Schnittgeometrie und der Blutgefäße. Maßstab: A, 500  $\mu$ m; B-D und H-J, 200  $\mu$ m; E-G und inset in B, 100  $\mu$ m

## **5. Diskussion**

Trotz des zu erwartenden ubiquitären Vorkommens sind die Polyamine Spd und Spm im Vergleich verschiedener neuronaler und glialer Zelltypen inhomogen verteilt (Fujiwara et al. 1997; Laube et al. 2002; Laube et al. 1997). Eine hiermit teilweise übereinstimmende, inhomogene Verteilung in Neuronen wurde auch für das Putrescinsyntheseenzym ODC beschrieben (Bernstein et al. 1999; Cintra et al. 1987; Junttila et al. 1993; Kilpelainen et al. 2000). Eine wesentliche Erkenntnis der vorliegenden Untersuchung ist die ebenfalls differentielle Expression der SpdS in verschiedenen Neuronenpopulationen. Während SpdS und Spd/Spm in einigen Kerngebieten, wie z.B. den supraoptischen und paraventriculären hypothalamischen Kernen, gemeinsam auftreten, zeigten sich in anderen Arealen deutliche Unterschiede in der Verteilung. Diese Diskrepanz lässt sich unter der Annahme von Transportprozessen und der daraus resultierenden Umverteilung von Spd und Spm in die Spd/Spm-positiven Zellen hinreichend erklären (Dot et al. 2000; Grillo et al. 1994; Harman et al. 1981; Masuko et al. 2003; Sakata et al. 2000; Seiler et al. 1996). Die Annahme einer Umverteilung von Polyaminen wird unterstützt durch die SpdS-Armut stark Spd/Spm-haltiger Astrozyten, die als Polyaminspeicher für neuronal synthetisierte Polyamine in Frage kommen (Laube et al. 1997). Die Lokalisation der Syntheseenzyme erlaubt daher wahrscheinlich genauere Rückschlüsse auf mögliche Funktionen der Polyaminbiosynthese in bestimmten Zelltypen oder subzellulären Kompartimenten (z.B. Synapsen) als die Darstellung der Polyamine selbst. Die verstärkte SpdS-Expression in mehreren zentralen Hirnregionen, wie dem Striatum, Nucleus accumbens, Hippokampus, Klein- und Großhirnrinde, weist darauf hin, dass hier ein Bedarf besteht, der über den basalen, zellulären Polyamingehalt hinausgeht. Unter den bekannten Interaktionen von Polyaminen mit Ionenkanälen und Rezeptoren kommt der Beeinflussung des NMDA-Rezeptors aufgrund seiner zentralen Rolle bei synaptischer Plastizität und der Ausstattung mit extrazellulären Polyaminbindungsstellen eine besondere Bedeutung zu. Im Striatum deutet die Konzentrierung der SpdS im „Patch Compartment“ sowie in putativen Interneuronen des umgebenden „Matrix Compartments“ auf eine funktionelle Rolle von Spd in den intrastriatalen „Patch/Matrix“-Schaltkreisen hin. Darüber hinaus bestehen Anhaltspunkte, dass Polyamine in striatale pathologische Prozesse, z.B. Chorea Huntington, involviert sind (Colton et al. 2004). Mehrere Anhaltspunkte deuten darauf hin, dass Spd/Spm über ihre modulatorische Wirkung auf NMDA-Rezeptoren (Williams 1997) möglicherweise Bedeutung für Mechanismen synaptischer Plastizität zukommt (Fage et al. 1992). Das mesolimbische dopaminerge System, in dem Suchtverhalten über synaptische Plastizität vermittelt wird (Thomas et al. 2003), stellt einen deutlichen Schwerpunkt der SpdS-Expression dar. Zu diesem System gehören das ventrale

tegmentale Areal (VTA), der Nucleus accumbens, der präfrontale Kortex, die Amygdala und der Hippokampus (Thomas et al. 2003). Hierunter enthielten insbesondere der Nucleus accumbens, der Hippocampus und der basolaterale und zentrale Amygdalakern deutlich SpdS-positive Neurone. Die SpdS-Verteilung im Nucleus accumbens, besonders im dorsomedialen Anteil, ähnelte stark dem striatalen Patch/Matrix-Muster und könnte somit auf eine analoge funktionelle Organisation benachbarter neurochemischer Kompartimente hinweisen (Gerfen 1992; Krauss et al. 2006). Diese SpdS-positiven Areale überlappen zudem mit denjenigen Arealen, die vermehrt D1-Dopamin-Rezeptoren aber wenig D2-Dopamin-Rezeptoren exprimieren (Jansson et al. 1999). Die SpdS-Verteilung in den dopaminergen Arealen des Nucleus accumbens und die Tatsache, dass Dopamin bei der Suchtentstehung im Nucleus accumbens (Di Chiara et al. 1999) eine wesentliche Rolle spielt, lässt eine Beteiligung der Polyamine an der Suchtpathogenese denkbar erscheinen. Ein zentraler molekularer Prozess der synaptischen Plastizität ist die NMDA-Rezeptor-abhängige Langzeitpotenzierung (LTP), die im Hippokampus und der lateralen Amygdala nicht nur in glutamatergen Projektionsneuronen sondern auch in inhibitorischen Interneuronen nachgewiesen wurde (Bauer et al. 2004; Kullmann et al. 2007). In beiden Arealen wurde eine deutliche SpdS-Expression in Interneuronen beobachtet. Physiologische Experimente haben gezeigt, dass Spd-Injektionen in die Amygdala die Angstkonditionierung bei Ratten verstärken (Rubin et al. 2004). Außerdem konnte sowohl in der Amygdala als auch im Hippokampus eine Beeinflussung von Gedächtnisleistungen durch lokale Spd-Applikation erzielt werden (Kishi et al. 1998; Rubin et al. 2004; Rubin et al. 2000; Rubin et al. 2001). Es erscheint somit möglich, dass endogenes Spd ähnliche Effekte hervorrufen könnte. Interessanterweise exprimieren SpdS-positive CA1-Pyramidenzellen NMDA-Rezeptor abhängiges LTP an Schaffer-Kollateralsynapsen, während SpdS-negative CA3-Pyramidenzellen NMDA-Rezeptor unabhängiges LTP in Moosfasersynapsen exprimieren. Die partielle Kollokalisierung von SpdS und neuronaler Stickoxidsynthase in hippocampalen Interneuronen könnte auf eine synergistische Wirkung von Spd und Stickstoffmonoxid hinweisen. Es konnte gezeigt werden, dass NO nicht nur an NMDA-Rezeptor vermittelter synaptischer Plastizität beteiligt ist (Garthwaite et al. 1995; Hopper et al. 2006), sondern offenbar auch mit den die Gedächtnisleistung steigernden Effekten von Spd in einem engen funktionellen Zusammenhang zu stehen scheint. So verhindert eine Inhibition der NO-Synthese die Spd-abhängig hervorgerufenen Gedächtniseffekte bei Ratten (Guerra et al. 2006). Die überraschende, ausgeprägte SpdS-Expression in zerebellären Moosfaserterminalien und, weniger stark ausgeprägt, auch in Parallel- und Kletterfaserboutons, legt eine funktionelle Bedeutung von Spd in diesen Synapsen nahe. Obwohl Moos-, Parallel- und Kletterfasern unterschiedliche morphologische und elektrophysiologische Eigenschaften haben

(Ito 2006), verfügen alle über Mechanismen zur Langzeitpotenzierung (D'Angelo et al. 1999; Salin et al. 1996; Shen et al. 2005). Sowohl in Moosfasern als auch in Parallelfasern wird LTP präsynaptisch generiert. In beiden Fällen sind zyklische Nukleotide, wie zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) oder zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) beteiligt. In Moosfasersynapsen führt ein stickstoffmonoxidabhängiger cGMP-Anstieg zur Steigerung der präsynaptischen Effizienz (D'Angelo et al. 2005). Ein möglicher Interaktionspartner für cGMP sind „cyclic nucleotide-gated channels“ (CNGC) (Ahern et al. 2002). Da Polyamine retinale (Lu et al. 1999) und olfaktorische (Lynch 1999) CNGCs blockieren können und in situ-Hybridisierungsdaten eine zerebelläre Lokalisation von zumindest zwei der vier CNGC A-Untereinheiten, A1 und A2, belegen, kommen diese Kanäle (Barnstable et al. 2004) möglicherweise als Effektoren synaptischer Spd-Synthese in Frage. Obwohl der Wirkungsmechanismus endogen gebildeten Spermidins im Kleinhirn nach wie vor unklar ist, belegen die Feldpotentialmessungen in der Körnerzellschicht, dass zumindest exogen zugeführtes Spermidin die synaptische Aktivität in diesem Areal konzentrationsabhängig hemmt. Der Befund einer ausgeprägten SpdS-Expression in der für die Entstehung der induzierten Feldpotentiale relevanten Moosfasersynapsen deutet darauf hin, dass ähnliche Effekte endogen hervorgerufen werden könnten. Aktivierungsabhängig könnte dies möglicherweise nur einen Teil der Synapsenpopulation betreffen. Im zerebralen Kortex waren kräftig SpdS-positive Neurone überwiegend in Schicht I lokalisiert. Ein Großteil dieser Neurone enthielt außerdem Reelin, ein sekretorisches Protein, das an synaptischer Plastizität beteiligt ist (Weeber et al. 2002) und die Aktivität von NMDA-Rezeptoren moduliert (Beffert et al. 2005; Chen et al. 2005). Da die Mehrzahl der Schicht I-Neurone GABAerg ist und auch die Mehrheit der Reelin positiven Neurone GABA enthält (Ramos-Moreno et al. 2006), deutet die prominente SpdS-Expression in diesen Zellen auf eine funktionelle Beteiligung von Spd und/oder Spm an inhibitorischen kortikalen Schaltkreisen (Gabbott et al. 1986; Hestrin et al. 1996) hin. Diese Interpretation wird durch die Tatsache unterstützt, dass Schicht I-Neurone sowohl untereinander als auch mit Pyramidenzellen der Schichten II/III synaptische Kontakte bilden (Chu et al. 2003).

Zusammenfassend lässt die unerwartete immunzytochemische Verteilung der SpdS auf region-, kern- und zellspezifische Schwerpunkte der Spermidinsynthese im Gehirn der Ratte schließen. Dabei sind innerhalb dieser Areale sowohl physiologische als auch pathophysiologische Funktionen von Spd oder Spm denkbar. Die Kenntnis über die regionale Synthese der Polyamine könnte so letztlich zur Entwicklung neuer Medikamente gegen Erkrankungen wie Chorea Huntington oder die Alkoholabhängigkeit beitragen.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Ahern, G. P., Klyachko, V. A., and Jackson, M. B. cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO Trends Neurosci. 2002 10 510-517
2. Bachrach, U., Wang, Y. C., and Tabib, A. Polyamines: new cues in cellular signal transduction News Physiol Sci. 2001 106-109
3. Barnstable, C. J., Wei, J. Y., and Han, M. H. Modulation of synaptic function by cGMP and cGMP-gated cation channels Neurochem.Int. 2004 6 875-884
4. Bauer, E. P. and LeDoux, J. E. Heterosynaptic long-term potentiation of inhibitory interneurons in the lateral amygdala J.Neurosci. 2004 43 9507-9512
5. Beffert, U., Weeber, E. J., Durudas, A., Qiu, S. et al. Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2 Neuron 2005 4 567-579
6. Benveniste, M. and Mayer, M. L. Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones J.Physiol 1993 131-163
7. Bernstein, H. G. and Muller, M. The cellular localization of the L-ornithine decarboxylase/polyamine system in normal and diseased central nervous systems Prog.Neurobiol. 1999 5 485-505
8. Bowie, D. and Mayer, M. L. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block Neuron 1995 2 453-462
9. Chen, Y., Beffert, U., Ertunc, M., Tang, T. S. et al. Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons J.Neurosci. 2005 36 8209-8216
10. Chu, Z., Galarreta, M., and Hestrin, S. Synaptic interactions of late-spiking neocortical neurons in layer 1 J.Neurosci. 2003 1 96-102
11. Cintra, A., Fuxe, K., Agnati, L. F., Persson, L. et al. Evidence for the existence of ornithine decarboxylase-immunoreactive neurons in the rat brain Neurosci.Lett. 1987 3 269-274

12. Colton, C. A., Xu, Q., Burke, J. R., Bae, S. Y. et al. Disrupted spermine homeostasis: a novel mechanism in polyglutamine-mediated aggregation and cell death *J.Neurosci.* 2004 32 7118-7127
13. D'Angelo, E., Rossi, P., Armano, S., and Taglietti, V. Evidence for NMDA and mGlu receptor-dependent long-term potentiation of mossy fiber-granule cell transmission in rat cerebellum *J.Neurophysiol.* 1999 1 277-287
14. D'Angelo, E., Rossi, P., Gall, D., Prestori, F. et al. Long-term potentiation of synaptic transmission at the mossy fiber-granule cell relay of cerebellum *Prog.Brain Res.* 2005 69-80
15. Di Chiara, G., Tanda, G., Bassareo, V., Pontieri, F. et al. Drug addiction as a disorder of associative learning. Role of nucleus accumbens shell/extended amygdala dopamine *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999 461-485
16. Donevan, S. D. and Rogawski, M. A. Intracellular polyamines mediate inward rectification of Ca(2+)-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995 20 9298-9302
17. Dot, J., Lluch, M., Blanco, I., and Rodriguez-Alvarez, J. Polyamine uptake in cultured astrocytes: characterization and modulation by protein kinases *J.Neurochem.* 2000 5 1917-1926
18. Fage, D., Voltz, C., Scatton, B., and Carter, C. Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by N-methyl-D-aspartate receptor activation in vivo *J.Neurochem.* 1992 6 2170-2175
19. Fakler, B., Brandle, U., Bond, C., Glowatzki, E. et al. A structural determinant of differential sensitivity of cloned inward rectifier K<sup>+</sup> channels to intracellular spermine *FEBS Lett.* 1994 2-3 199-203
20. Fakler, B., Brandle, U., Glowatzki, E., Weidemann, S. et al. Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K<sup>+</sup> channels is caused by intracellular spermine *Cell* 1995 1 149-154

21. Ficker, E., Tagliatalata, M., Wible, B. A., Henley, C. M. et al. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K<sup>+</sup> channels *Science* 1994 5187 1068-1072
22. Fujiwara, K., Bai, G., and Kitagawa, T. Polyamine-like immunoreactivity in rat neurons *Brain Res.* 1997 1 166-171
23. Gabbott, P. L. and Somogyi, P. Quantitative distribution of GABA-immunoreactive neurons in the visual cortex (area 17) of the cat *Exp. Brain Res.* 1986 2 323-331
24. Garthwaite, J. and Boulton, C. L. Nitric oxide signaling in the central nervous system *Annu. Rev. Physiol* 1995 683-706
25. Gerfen, C. R. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization *Trends Neurosci.* 1992 4 133-139
26. Grillo, M. A. and Colombatto, S. Polyamine transport in cells *Biochem. Soc. Trans.* 1994 4 894-898
27. Guerra, G. P., Mello, C. F., Sauzem, P. D., Berlese, D. B. et al. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats *Psychopharmacology (Berl)* 2006 2 150-158
28. Harman, R. J. and Shaw, G. G. The spontaneous and evoked release of spermine from rat brain in vitro *Br. J. Pharmacol.* 1981 1 165-174
29. Hestrin, S. and Armstrong, W. E. Morphology and physiology of cortical neurons in layer I *J. Neurosci.* 1996 17 5290-5300
30. Hiroi, N. Compartmental organization of calretinin in the rat striatum *Neurosci. Lett.* 1995 3 223-226
31. Hopper, R. A. and Garthwaite, J. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation *J. Neurosci.* 2006 45 11513-11521
32. Hougaard, D. M. Polyamine cytochemistry: localization and possible functions of polyamines *Int. Rev. Cytol.* 1992 51-88
33. Igarashi, K. and Kashiwagi, K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000 3 559-564

34. Isa, T., Iino, M., Itazawa, S., and Ozawa, S. Spermine mediates inward rectification of Ca(2+)-permeable AMPA receptor channels *Neuroreport* 1995 15 2045-2048
35. Ito, M. Cerebellar circuitry as a neuronal machine *Prog.Neurobiol.* 2006 3-5 272-303
36. Jansson, A., Goldstein, M., Tinner, B., Zoli, M.et al. On the distribution patterns of D1, D2, tyrosine hydroxylase and dopamine transporter immunoreactivities in the ventral striatum of the rat *Neuroscience* 1999 2 473-489
37. Junttila, T., Hietanen-Peltola, M., Recharadt, L., Persson, L.et al. Ornithine decarboxylase-like immunoreactivity in rat spinal motoneurons and motoric nerves *Brain Res.* 1993 1-2 149-153
38. Kamboj, S. K., Swanson, G. T., and Cull-Candy, S. G. Intracellular spermine confers rectification on rat calcium-permeable AMPA and kainate receptors *J.Physiol* 1995 297-303
39. Kawaguchi, Y. Neostriatal cell subtypes and their functional roles *Neurosci.Res.* 1997 1 1-8
40. Kilpelainen, P., Rybnikova, E., Hietala, O., and Pelto-Huikko, M. Expression of ODC and its regulatory protein antizyme in the adult rat brain *J.Neurosci.Res.* 2000 5 675-685
41. Kishi, A., Ohno, M., and Watanabe, S. Spermidine, a polyamine site agonist, attenuates working memory deficits caused by blockade of hippocampal muscarinic receptors and mGluRs in rats *Brain Res.* 1998 1-2 311-314
42. Koh, D. S., Burnashev, N., and Jonas, P. Block of native Ca(2+)-permeable AMPA receptors in rat brain by intracellular polyamines generates double rectification *J.Physiol* 1995 305-312
43. Krauss, M., Langnaese, K., Richter, K., Brunk, I.et al. Spermidine synthase is prominently expressed in the striatal patch compartment and in putative interneurons of the matrix compartment *J.Neurochem.* 2006 1 174-189
44. Krauss, M., Weiss, T., Langnaese, K., Richter, K.et al. Cellular and subcellular rat brain spermidine synthase expression patterns suggest region-specific roles for polyamines, including cerebellar pre-synaptic function *J.Neurochem.* 2007 2 679-693

45. Kullmann, D. M. and Lamsa, K. P. Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons *Nat.Rev.Neurosci.* 2007 9 687-699
46. Laube, G., Bernstein, H. G., Wolf, G., and Veh, R. W. Differential distribution of spermidine/spermine-like immunoreactivity in neurons of the adult rat brain *J.Comp Neurol.* 2002 4 369-386
47. Laube, G. and Veh, R. W. Astrocytes, not neurons, show most prominent staining for spermidine/spermine-like immunoreactivity in adult rat brain *Glia* 1997 2 171-179
48. Lopatin, A. N., Makhina, E. N., and Nichols, C. G. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification *Nature* 1994 6504 366-369
49. Lopatin, A. N., Makhina, E. N., and Nichols, C. G. The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines *J.Gen.Physiol* 1995 5 923-955
50. Lu, Z. and Ding, L. Blockade of a retinal cGMP-gated channel by polyamines *J.Gen.Physiol* 1999 1 35-43
51. Lynch, J. W. Rectification of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel by intracellular polyamines *J.Membr.Biol.* 1999 3 213-227
52. Mansour, A., Fox, C. A., Burke, S., Akil, H. et al. Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS *J.Chem.Neuroanat.* 1995 4 283-305
53. Masuko, T., Kusama-Eguchi, K., Sakata, K., Kusama, T. et al. Polyamine transport, accumulation, and release in brain *J.Neurochem.* 2003 3 610-617
54. Minami, M., Onogi, T., Toya, T., Katao, Y. et al. Molecular cloning and in situ hybridization histochemistry for rat mu-opioid receptor *Neurosci.Res.* 1994 4 315-322
55. Pegg, A. E. and McCann, P. P. Polyamine metabolism and function *Am.J.Physiol* 1982 5 C212-C221
56. Pompeia, C., Ortis, F., and Armelin, M. C. Immunopurification of polyclonal antibodies to recombinant proteins of the same gene family *Biotechniques* 1996 6 986-8, 990

57. Ramos-Moreno, T., Galazo, M. J., Porrero, C., Martinez-Cerdeno, V. et al. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity: immunomapping of intracellular and secreted Reelin in the adult rat brain *Eur.J.Neurosci.* 2006 2 401-422
58. Rubin, M. A., Berlese, D. B., Stiegemeier, J. A., Volkweis, M. A. et al. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats *J Neurosci.* 2004 9 2328-2334
59. Rubin, M. A., Boemo, R. L., Jurach, A., Rojas, D. B. et al. Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats *Behav.Pharmacol.* 2000 1 57-61
60. Rubin, M. A., Stiegemeier, J. A., Volkweis, M. A., Oliveira, D. M. et al. Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats *Eur.J.Pharmacol.* 2001 1 35-39
61. Sakata, K., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. Properties of a polyamine transporter regulated by antizyme *Biochem.J.* 2000 297-303
62. Salin, P. A., Malenka, R. C., and Nicoll, R. A. Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses *Neuron* 1996 4 797-803
63. Seiler, N., Delcros, J. G., and Moulinoux, J. P. Polyamine transport in mammalian cells. An update *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 1996 8 843-861
64. Shen, Y. and Linden, D. J. Long-term potentiation of neuronal glutamate transporters *Neuron* 2005 5 715-722
65. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid *Anal.Biochem.* 1985 1 76-85
66. Tabor, C. W. and Tabor, H. Polyamines *Annu.Rev.Biochem.* 1984 749-790
67. Tabor, H. and Tabor, C. W. SPERMIDINE, SPERMINE, AND RELATED AMINES *Pharmacol.Rev.* 1964 245-300
68. Thomas, M. J. and Malenka, R. C. Synaptic plasticity in the mesolimbic dopamine system *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 2003 1432 815-819

69. Weeber, E. J., Beffert, U., Jones, C., Christian, J. M. et al. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning *J.Biol.Chem.* 2002 42 39944-39952
70. Williams, K. Interactions of polyamines with ion channels *Biochem.J* 1997 289-297

## **7. Curriculum vitae**

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

## **8. Publikationsliste**

1. **Krauss M**, Langnaese K, Richter K, Brunk I, Wieske M, Ahnert-Hilger G, Veh RW, Laube G. Spermidine synthase is prominently expressed in the striatal patch compartment and in putative interneurons of the matrix compartment. *J Neurochem.* 2006, 97(1):174-189.
2. **Krauss M**, Weiss T, Langnaese K, Richter K, Kowski A, Veh RW, Laube G. 2007. Cellular and subcellular rat brain spermidine synthase expression patterns suggest region-specific roles for polyamines, including cerebellar pre-synaptic function. *J Neurochem.* 2007, 103(2):679-693.
3. Langnaese K, Richter K, Smalla KH, **Krauss M**, Thomas U, Wolf G, Laube G. Splice-isoform specific immunolocalization of neuronal nitric oxide synthase in mouse and rat brain reveals that the PDZ-complex-building nNOSalpha beta-finger is largely exposed to antibodies. *Dev Neurobiol.* 2007, 67(4):422-437.
4. Kowski AB, Geisler S, **Krauss M**, Veh RW. Differential projections from subfields in the lateral preoptic area to the lateral habenular complex of the rat. *J Comp Neurol.* 2008, 507(4):1465-1478.

## **9. Anteilserklärung**

Die Promovendin/der Promovend hatte folgenden Anteil an den eingereichten Publikationen:

Publikation 1: Spermidine synthase is prominently expressed in the striatal patch compartment and in putative interneurons of the matrix compartment.

Prozent: 60

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

- Erhebung sämtlicher experimenteller Daten mit Ausnahme von Fig 4 Erstellung der Fig 1,2,3,5 und 6
- Verfassen des Textes in Teilen

Publikation 2: Splice-isoform specific immunolocalization of neuronal nitric oxide synthase in mouse and rat brain reveals that the PDZ-complex-building nNOSalpha beta-finger is largely exposed to antibodies.

Prozent: 20

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

- Immunzytochemische Charakterisierung eines pan-nNOS Antikörpers aus der Ziege, der ebenfalls für Doppelmarkierungsexperimente bei der Bearbeitung des eigenen Themas benötigt wurde.

Publikation 3: Cellular and subcellular rat brain spermidine synthase expression patterns suggest region-specific roles for polyamines, including cerebellar pre-synaptic function.

Prozent: 50

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

- Erhebung der experimentellen Daten von Fig. 1a-f; 2; 3a,b; 4a-c; 5;6 und 7
- Erstellung der Fig 1a-f,2,3a,b, 5,6 und 7
- Verfassen des Textes in Teilen

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin und Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Hochschullehrer/in

Doktorand/in

Prof. Dr. R.W. Veh

Michael Krauß

## **10. Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Michael, Krauß erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Verteilung von Spermidinsynthese im Rattenhirn“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Ich, Michael, Krauß erkläre an Eides statt, dass keine gerichtlichen Vorstrafen einschließlich noch anhängiger staatsanwaltlicher Ermittlungsverfahren und Disziplinarverfahren vorliegen.

Datum

Gez.

Michael Krauß

## **11. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Rüdiger W. Veh danke ich sehr herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die bereitwillig gewährte Unterstützung bei der Bearbeitung meines Themas sowie die stets anregenden, naturwissenschaftlichen Diskussionen und Denkanstöße.

Für das Thema dieser Arbeit und für die exzellente Anleitung möchte ich mich bei Herrn Dr. Gregor Laube ausdrücklich bedanken, der es mir ermöglichte, diese Dissertation studienbegleitend durchzuführen. Ich habe davon nicht nur fachlich sondern auch persönlich und menschlich profitiert, dafür herzlichen Dank!

Mein besonderer Dank gilt Frau Petra Loge, die mich mit großer Geduld und unermüdlichem Enthusiasmus in eine Vielzahl äußerst nützlicher Labortechniken eingewiesen hat.

Bei meinen zahlreichen weiteren Kollegen aus dem Institut für Integrative Neuroanatomie möchte ich mich sehr herzlich kollektiv bedanken. Ausdrücklich möchte ich mich bedanken bei Dr. Martin Wieske, Semanur Ünsal, Dr. Torsten Weiß und Annett Kaphan die mich auch auf fremdem Terrain sicher geleitet haben.

Frau Prof. Dr. G. Ahnert-Hilger möchte ich ebenfalls für die hilfreichen Diskussionen danken.

Abschließend danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mir durch ihre Motivation und ihren Rückhalt den nötigen Freiraum für meine Arbeit gegeben haben.