UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuroanatomie

Prof. Dr. Gabriele M. Rune

Einfluss von einer L-Phenylalanin – Hydroxylase Defizienz auf die Entwicklung von Synapsen im Model der Pah^{enu2} – Maus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Sarah Schulz aus Geilenkirchen

Hamburg 2014

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Horling K, Gudrun Schlegel G, Schulz S, Vierk R, Ullrich K, Santer R, Rune GM. 2015. Hippocampal synaptic connectivity in phenylketonuria. *Human Molecular Genetics*, *24 (No. 4): 1007–1018.*

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.02.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende:Prof. Dr. Gabriele M. RunePrüfungsausschuss, zweiter Gutachter:Prof. Dr. René Santer

Inhaltsverzeichnis

1		Ab	bildungsverzeichnis	6
2		Ab	kürzungsverzeichnis	8
3		Tab	pellenverzeichnis	10
4		Ein	leitung	11
	4.1	Einf	ührung	11
	4.2	Phe	enylketonurie	12
	4.2	2.1	Biochemie des Phenylalanins	12
	4.2	2.2	Formen der Hyperphenylalaninämien	13
		4.2.2	.1 Klassische PKU	13
		4.2.2	.2 Tetrahydrobiopterin-Synthese-Defekte (Atypische PKU)	15
		4.2.2	.3 Weitere Unterteilung der Hyperphenylalaninämie	15
		4.2.2	.4 Maternale PKU	16
	4.2	2.3	Genetik	17
	4.2	2.4	Geschichte	17
	4.2	2.5	Diagnostik	18
	4.2	2.6	Therapie	20
	4.2	2.7	Veränderungen durch Phenylalanin im Gehirn	22
	4.3	Ana	atomie des Hippocampus	26
	4.3	3.1	Lage und Aufbau des humanen Hippocampus	26
	4.3	3.2	Aufbau und Lage des Mäusehippocampus	29
	4.3	3.3	Neuronale Verschaltung des Hippocampus	
	4.4	Auf	bau und Funktionen von Synapsen	
	4.5	Die	Pah ^{enu2} -Maus	
	4.6	Arb	eitshypothese und Fragestellung	

5	Material
5.1	Arbeitsmaterial und Geräte
5.2	Software40
5.3	Chemikalien
5.4	Lösungen41
6	Methoden43
6.1	Eingesetzte Tiere43
6.2	Perfusion und Entnahme der Hippocampi43
6.3	Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie44
6.4	Stereologische Auszählung der Spinesynapsen in den Hippocampusregionen CA1 und CA346
6.5	Auswertung durch Vergleich der Spinesynapsenzahlen der Pah ^{enu2} -Mäuse und Wildtypkontrollen der jeweiligen Altersstufe47
7	Ergebnisse
7 7.1	Ergebnisse48Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwei Wochen alten Mäuse50
7 7.1 7.2	Ergebnisse48Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwei Wochen alten Mäuse50Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der drei Wochen alten Mäuse52
7 7.1 7.2 7.3	Ergebnisse48Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwei Wochen alten Mäuse50Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der drei Wochen alten Mäuse52Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der vier Wochen alten Mäuse54
7 7.1 7.2 7.3 7.4	Ergebnisse48Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwei Wochen alten Mäuse50Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der drei Wochen alten Mäuse52Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der vier Wochen alten Mäuse54Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der acht Wochen alten Mäuse56
7.1 7.2 7.3 7.4 7.5	Ergebnisse48Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwei Wochen alten Mäuse50Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der drei Wochen alten Mäuse52Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der vier Wochen alten Mäuse54Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der acht Wochen alten Mäuse56Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwölf Wochen alten Mäuse58
7 7.1 7.2 7.3 7.4 7.5 7.6	Ergebnisse48Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwei Wochen alten Mäuse50Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der drei Wochen alten Mäuse52Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der vier Wochen alten Mäuse54Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der acht Wochen alten Mäuse56Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwölf Wochen alten Mäuse58Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der 35 Wochen alten Mäuse60
 7.1 7.2 7.3 7.4 7.5 7.6 7.7 	Ergebnisse48Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwei Wochen alten Mäuse50Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der drei Wochen alten Mäuse52Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der vier Wochen alten Mäuse54Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der acht Wochen alten Mäuse56Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwölf Wochen alten Mäuse58Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der 35 Wochen alten Mäuse60Verlauf der Spinesynapsenentwicklung in der CA1 Region62
 7.1 7.2 7.3 7.4 7.5 7.6 7.7 7.8 	Ergebnisse48Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwei Wochen alten Mäuse50Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der drei Wochen alten Mäuse52Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der vier Wochen alten Mäuse54Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der acht Wochen alten Mäuse56Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwölf Wochen alten Mäuse58Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der 35 Wochen alten Mäuse60Verlauf der Spinesynapsenentwicklung in der CA1 Region62Verlauf der Spinesynapsenentwicklung in der CA3 Region65
 7.1 7.2 7.3 7.4 7.5 7.6 7.7 7.8 8 	Ergebnisse 48 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwei Wochen alten Mäuse 50 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der drei Wochen alten Mäuse 52 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der vier Wochen alten Mäuse 54 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der acht Wochen alten Mäuse 56 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwölf Wochen alten Mäuse 58 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der 35 Wochen alten Mäuse 60 Verlauf der Spinesynapsenentwicklung in der CA1 Region 62 Verlauf der Spinesynapsenentwicklung in der CA3 Region 65 Diskussion 67
 7.1 7.2 7.3 7.4 7.5 7.6 7.7 7.8 8 8.1 	Ergebnisse 48 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwei Wochen alten Mäuse 50 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der drei Wochen alten Mäuse 52 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der vier Wochen alten Mäuse 54 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der acht Wochen alten Mäuse 56 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwölf Wochen alten Mäuse 58 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der 35 Wochen alten Mäuse 60 Verlauf der Spinesynapsenentwicklung in der CA1 Region 62 Verlauf der Spinesynapsenentwicklung in der CA3 Region 65 Diskussion 67 Spreading und Pruning während der Synaptogenese 67
 7.1 7.2 7.3 7.4 7.5 7.6 7.7 7.8 8 8.1 8.2 	Ergebnisse 48 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwei Wochen alten Mäuse 50 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der drei Wochen alten Mäuse 52 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der vier Wochen alten Mäuse 54 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der acht Wochen alten Mäuse 56 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwölf Wochen alten Mäuse 58 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der 35 Wochen alten Mäuse 60 Verlauf der Spinesynapsenentwicklung in der CA1 Region 62 Verlauf der Spinesynapsenentwicklung in der CA3 Region 65 Diskussion 67 Spreading und Pruning während der Synaptogenese. 67 Warum könnte das Pruning bei der PKU gestört sein? 71

8.4	Anstieg der Synapsen in der Generation der 35 Wochen	73
8.5	Einordnung der Ergebnisse im Vergleich zu anderen Erkrankungen, die mit einer mentaler Retardierung einhergehen	75
8.6	Einordnung der Ergebnisse in den Stand der PKU-Forschung	77
8.7	Resümee	78
9	Zusammenfassung	80
10	Literaturverzeichnis	81
11	Danksagung	93
12	Lebenslauf	94
13	Eidesstattliche Versicherung	95

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung zur Hydroxylierung desPhenylalanins zu Tyroxin.13
Abbildung 2: Schema zur Leitlinien konformen Konfirmationsdiagnostik bei einer Hyperphenylalaninämie im Rahmen des Neugeborenenscreenings
Abbildung 3: Medianansicht des menschlichen Gehirns
Abbildung 4: Histologischer Aufbau und Faserverbindungen des Hippocampus29
Abbildung 5: Intrahippocampale Verschaltung
Abbildung 6: EM-Bild einer Gray I-Synapse
Abbildung 7: Aufnahme einer adulten Pah ^{enu2} -Maus mit einer adulten Wildtyp-Maus
Abbildung 8: Siehe Abb. 646
Abbildung 9: Ausschnitt aus EM-Bildern der 35 Wochen alten Mäuse der CA1 Region49
Abbildung 10: Ausschnitt aus EM-Bildern der 35 Wochen alten Mäuse der CA3 Region49
Abbildung 11: Säulendiagramm der Spinesynapsen der Generation 2 Wochen in den Regionen CA1 und CA352
Abbildung 12: Säulendiagramm der Spinesynapsen der Generation 3 Wochen in den Regionen CA1 und CA354
Abbildung 13: Säulendiagramm der Spinesynapsen der Generation 4 Wochen in den Regionen CA1 und CA356
Abbildung 14: Säulendiagramm der Spinesynapsen der Generation 8 Wochen in den Regionen CA1 und CA3

6

Abbildung 15: Säulendiagramm der Spinesynapsen der Generation 12 Wochen
in den Regionen CA1 und CA360
Abbildung 16: Säulendiagramm der Spinesynapsen der Generation 35 Wochen
in den Regionen CA1 und CA362
Abbildung 17: Säulendiagramm des Verlaufes der Spinesynapsenentwicklung der
WT-Kontrollgruppe über den gesamten untersuchten Zeitraum in der CA1 Region63
Abbildung 18: Säulendiagramm des Verlaufes der Spinesynapsenentwicklung der
KO-Mäuse und der WT-Mäuse Kontrollgruppe über den gesamten untersuchten
Zeitraum in der CA1 Region64
Abbildung 19: Säulendiagramm des Verlaufes der Spinesynapsenentwicklung der
KO-Mäuse und der WT-Mäuse Kontrollgruppe über den gesamten untersuchten
Zeitraum in der CA3 Region66

2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µmol	Mikromol
µmol/l	Mikromol pro Liter
3-MT	3-Methoxytyramin
5-HIAA	5-Hydroxyindoleacetic acid (5-Hydroxyindolessigsäure)
5-HT	5-Hydroxytryptamin
Abb	Abbildung
AC	Kontralaterale Fasern
AMPAR	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
	<i>rezeptor</i> (α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-
	isoxazolpropionsäure Rezeptor)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BH ₄	(6R)-L-erythro-5, 6, 7, 8-Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
CA	Cornu ammonis (Ammonshorn)
CA1	Cornu ammonis Region 1
CA3	Cornu ammonis Region 3
DHPR	Dihydropteridinreduktase
DG	Gyrus dentatus
DOPAC	3-4-Dihydroxyphenylaceticacid (3-4-
	Dihydroxyphenylessigsäure)
EM	Elektronenmikrokopie
Enu	Ethylnitrosourea (Ethylnitrosoharnstoff)
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
GABA	γ-Aminobuttersäure
g	Gramm
g/kg/Tag	Gramm pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag
HPA	Hyperphenylalaninämie
HVA	Homovanillic acid (Homovanillinsäure)
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potenzial
IQ	Intelligenzquotient
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

КО	Pah ^{enu2} -Maus
I	Liter
li	links
Μ	Molar (mol/l)
MF	Moosfasern
mg	Milligramm
MHP	Milde Hyperphenylalaninämie
MHPG	3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol
min	Minute
mind	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mmol/l	Millimol pro Liter
mol	Stoffmenge (1 mol = $6,023 \times 10^{23}$ Teilchen)
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Non-NMDAR	Non- N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
Nucl	Nucleus
р	Signifikanzniveau
PAH	Phenylalaninhydroxylase
Phe	Phenylalanin
PKU	Phenylketonurie
q-DHPR	q-Dihydropteridinreduktase
re	rechts
SC	Schafferkollaterale
Sb	Subiculum
Tab	Tabelle
ТР	Tractus perforans
WT	Wildtyp-Maus
ZNS	Zentralnervensystem

3 Tabellenverzeichnis

 Tabelle 1: Vergleich der Spinesynapsen der Generation 2 Wochen in der CA1 Region.......50
 Tabelle 2: Vergleich der Spinesynapsen der Generation 2 Wochen in der CA3 Region......51 Tabelle 3: Vergleich der Spinesynapsen der Generation 3 Wochen in der CA1 Region......53 Tabelle 4: Vergleich der Spinesynapsen der Generation 3 Wochen in der CA3 Region......53
 Tabelle 5: Vergleich der Spinesynapsen der Generation 4 Wochen in der CA1 Region.......55

 Tabelle 6: Vergleich der Spinesynapsen der Generation 4 Wochen in der CA3 Region.......55
 Tabelle 7: Vergleich der Spinesynapsen der Generation 8 Wochen in der CA1 Region......57
 Tabelle 8: Vergleich der Spinesynapsen der Generation 8 Wochen in der CA3 Region.......57
 Tabelle 9: Vergleich der Spinesynapsen der Generation 12 Wochen in der CA1 Region.....59 Tabelle 10: Vergleich der Spinessynapsen der Generation 12 Wochen in der CA3 Region. 59 Tabelle 11: Vergleich der Spinesynapsen der Generation 35 Wochen in der CA1 Region ...61 Tabelle 12: Vergleich der Spinesynapsen der Generation 35 Wochen in der CA3 Region ..61
 Tabelle 13:
 Vergleich der Spinesynapsenentwicklung in der CA1 Region.
 64

 Tabelle 14:
 Vergleich der Spinesynapsenentwicklung in der CA3 Region.
 65

10

4 Einleitung

4.1 Einführung

Die Phenylketonurie (PKU) ist mit einer Inzidenz von 1:7000 die häufigste genetisch bedingte Störung des Aminosäurenstoffwechsels (Mayatepek, 2007).

Diese Erkrankung ist auf einen autosomal-rezessiven vererbten Defekt im Gen der L-Phenylalaninhydroxylase (PAH) zurückzuführen, welcher zu einer reduzierten bis zu komplett fehlender Enzymaktivität führen kann. Bisher sind mehr als 400 Mutationen dieses Genes bekannt. Durch diesen Defekt kann die essenzielle Aminosäure Phenylalanin (Phe) nicht zu Tyrosin hydroxyliert werden, dies führt zu einem Anstieg der aromatischen Aminosäure Phenylalanin in Plasma und Liquor und die Aminosäure Tyrosin wird zu einer essenziellen Aminosäure, die lediglich exogen durch die Nahrung aufgenommen werden kann.

Das Phenylalanin, welches bei dieser Erkrankung in hohen Konzentrationen vorliegt, wird hauptsächlich zu Phenylpyruvat transaminiert und renal ausgeschieden. Das Phenylpyruvat ist durch seine Ketongruppe namensgebend.

Klinisch manifest wird die PKU, wenn die Erkrankung nicht in den ersten Lebensmonaten erkannt und behandelt wird und so ein Steigen der Phenylalanin-Spiegel im Serum nicht verhindert werden kann. Die Symptomatik beginnt mit häufigem Erbrechen, eigentümlichen Hautgeruch, Mikrozephalie, Epilepsie und einer mentalen Retardierung, im Weiteren kann es danach noch zu einer progressiven motorischen Störung kommen. Um die Folgen dieser Erkrankung zu vermeiden, wird am dritten Lebenstag das Neugeborenenscreening durchgeführt, bei dem unter anderem der Phenylalanin-Spiegel im Blut der Neugeborenen bestimmt wird und bei einem Phenylalanin-Spiegel über 600 µmol/l mit einer phenylalaninarmen Diät des Neugeborenen begonnen wird.

Die genaue Pathogenese dieser Erkrankung ist bisher noch unklar, insbesondere wie die Erhöhung der Aminosäure Phenylalanin zu einer mentalen Retardierung führen kann. Viele Erkrankungen mit mentaler Retardierung weisen als gemeinsames pathologisches Korrelat sowohl eine gestörte Dendritendifferenzierung als auch eine Veränderung der dendritischen Spines und der Synapsen auf.

Dendriten dienen als zentrale Struktur der Neuronen der Erregungsweiterleitung (Informationsweiterleitung). Sie leiten die Information afferent, welche sie über die

Synapsen erhalten haben, aus der Peripherie zum Neuron. Weiter können sich Dendriten zu Dendritenbäumen verzweigen und als membranöse Ausstülpungen Spines tragen. Spines sind dabei als postsynaptische Struktur wesentlich an der synaptischen Plastizität beteiligt.

4.2 <u>Phenylketonurie</u>

4.2.1 Biochemie des Phenylalanins

Die Aminosäure Phenylalanin wird als essentielle Aminosäure ausschließlich über die Nahrung aufgenommen. Das sich im Blut befindliche Phenylalanin wird durch die besonders in der Leber vorkommende Phenylalaninhydroxylase zu Tyrosin hydroxyliert (Mayatepek, 2007).

Die PAH gehört zu den nicht-Häm-Eisen(II)-haltigen Enzymen und ist ein 50 kDa großes Monomer. Es besteht aus drei Domänen, aus der regulatorischen Domäne (Aminosäuren (AS) 1-142), aus der katalytischen Domäne (AS 143-410) und aus der Tetramerisierungsdomäne (AS 411-452), welche wichtig für die Tetramerstruktur des Enzyms sind, wobei auch die Dimerstruktur enzymatische Aktivität besitzt. Es werden Mutationen in allen der drei Domänen gefunden, die in der katalytischen Domäne gehen dabei häufig mit einer schweren PKU einher (Steinfeld et al., 2003).

Die PAH zählt zu den Monooxygenasen. Sie ist in der Lage molekularen Sauerstoff aufzunehmen, diesen zu spalten und ein Sauerstoff-Atom auf das Substrat zu übertragen, während das zweite Sauerstoff-Atom zur Bildung von Wasser verwendet wird (Rassow, 2012).

Die PAH benötigt als Reduktionsmittel den Cofaktor Tetrahydrobiopterin (BH₄), welches durch die Reaktion zu Dihydrobiopterin oxidert wird (s. Abb. 1). Das Dihydrobiopterin wird dann durch die Dihydrobiopteridinreduktase wieder zu BH₄ reduziert.

Das bei der Reduktion des Phe entstandene Tyrosin dient dem Körper als Ausgangssubstanz für weitere Stoffwechselprozesse. Das Tyrosin kann z.B. zu Melanin, Katecholaminen oder auch Thyroxin synthetisiert werden (Rassow, 2012).

12



Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung zur Hydroxylierung des Phenylalanins zu Tyroxin mit dem notwendigen Cofaktor Tetrahydrobiopterin, dessen Oxidation zu Dihydrobiopterin und anschließende Reduktion mittels Dihydropteridinreduktase. Weiter sind die Synthesewege des Tyrosins dargestellt. PAH = Phenylalaninhydroxylase, DHPR = Dihydropteridinreduktase.

4.2.2 Formen der Hyperphenylalaninämien

4.2.2.1 Klassische PKU

Der klassischen PKU liegen verschiedene Mutationen im PAH-Gen zugrunde, die dazu führen, dass die Phenylalaninhydroxylase keine bzw. eine geringe Aktivität aufweist. Dies macht einen Anteil von 98 % bei den Hyperphenylalaninämien aus (Mayatepek, 2007). Das Phenylalanin kann nicht zu Tyrosin hydroxyliert werden. Es kumuliert in Blut und Liquor in Abhängigkeit von der Menge, die mit der Nahrung zugeführt wird. Ein Teil des Phenylalanins wird zur Proteinsynthese umgesetzt. Alternative Stoffwechselwege wie der Abbau zu Phenylbrenztraubensäure und der renalen Ausscheidung spielen dabei eine untergeordnete Rolle. Charakteristisch ist hierbei ein Anstieg des Phenylalanin-Spiegels im Blut von über 1200 µmol/l unter normaler Eiweißzufuhr. Die Restaktivität der PAH liegt hier dann bei < 1 %.

Bei sehr hohen Phenylalanin-Spiegeln wird das Phenylalanin teilweise zu Phenylketonen (Phenylpyruvat, Phenyllaktat, Phenylacetat) verstoffwechselt und über den Urin ausgeschieden, diese können den klassischen mäuseartigen Körperund Uringeruch verursachen (Mayatepek, 2007).

Mangel Aminosäure Tyrosin, welches Durch den der seinerseits als Ausgangssubstanz für die Synthese von Thyroxin, Katecholaminen und Melanin dient, ist die Synthese dieser Stoffwechselprozesse gestört. So weisen die Patienten durch die Melaninsynthesestörung einen hellen Hauttyp mit hellblonden Haaren auf. Klinisch sind die Neugeborenen bei der Geburt primär unauffällig. Unbehandelt zeigen die Patienten bereits innerhalb des ersten Lebensjahres eine ausgeprägte progrediente Entwickelungsverzögerung, die in eine mentale Retardierung mit IQ-Werten von < 30 münden kann, wobei der IQ-Wert der Patienten nicht mit der aktuellen Phenylalaninkonzentration, sondern mit dem Lebensmittelwert der Phenylalaninkonzentration korreliert (Weglage et al., 1996a). Es manifestieren sich häufig schon im Säuglingsalter zerebrale Krampfanfälle. Des Weiteren zeigen sich Mikrozephalien, extrapyramidale Symptome mit gesteigerten Muskeleigenreflexen. Weiterhin zeigen sich Verhaltensauffälligkeiten wie Hyperaktivität, Autismus, Aggressivität, vermehrte Wutanfälle, Schreiepisoden und auch Autoagressionen bis hin zur Selbstverstümmelung (Wood et al., 1967; Mayatepek, 2007; Mitchell, 2013). Dermatologisch zeigen die Säugling juckende ekzematoide Dermatiden (Mayatepek, 2007; Mitchell, 2013). Im weiteren Verlauf des Lebens werden ein Tremor, eine

Bei Patienten mit einer früh behandelten PKU findet man ebenso neurologische Defizite. Diese Patienten weisen trotz durchschnittlicher IQ-Werte schlechtere Ergebnisse in motorischen und Konzentrationsaufgaben auf. Des Weiteren korreliert die Phenylalaninkonzentration mit der Schwäche der Feinmotorik (Weglage et al., 1995). Früh behandelte PKU Patienten haben ein erhöhtes Risiko für emotionale Störungen und Verhaltensstörungen, wobei die psychosozialen Probleme erst bei älteren Patienten eine Rolle zu spielen scheinen (Weglage et al., 1996b). Dies wird wahrscheinlich durch Stress ausgelöst, welcher zum einen durch die beschwerliche phenylalaninarme Diät und zum anderen generell durch das Stigmata der chronischen Erkrankung zu erklären ist (Weglage et al., 1996b). Außerdem haben besonders Jugendliche, welche ihre Therapie nachlässiger handhaben und so nach Absetzen der Protein-Ergänzungsmittel sich weiterhin proteinarm ernähren gelegentlich einen Vitamin B12-Mangel (Robinson et al., 2000; Mitchell, 2013). Des Weiteren findet man sowohl bei früh als auch bei spät diagnostizierten Patienten eine hohe Inzidenz für Osteopenie (Schwahn et al., 1998; Pérez-Dueñas et al., 2002;

Paraplegie oder auch eine Hemiplegie beobachtet (Mitchell, 2013).

Modan-Moses et al., 2007), ob dies ein Effekt der PKU oder eine Folge der proteinarmen Diät sein könnte, ist noch nicht hinreichend geklärt.

4.2.2.2 Tetrahydrobiopterin-Synthese-Defekte (Atypische PKU)

Das BH₄ dient der PAH als Cofaktor. Es ist bei der Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin erforderlich. BH₄ wird zu Dihydrobiopterin oxidiert. Mit Hilfe der Dihydropteridinreduktase wird das BH₄ wiederhergestellt. Ein Defekt in diesem Enzym führt so auch zu einer eingeschränkten Funktion der PAH, früher bekannt unter dem Terminus "atypischer PKU". Der Phenylalanin-Spiegel liegt hier allerdings unterhalb von 1200 µmol/l, jedoch oberhalb des physiologischen Phenylalanin-120 µmol/l. Dieser Defekt verursacht circa 2 % Spiegels von der Hyperphenylalaninämien (Mayatepek, 2007).

BH₄ dient ebenso als Cofaktor bei der Hydroxylierung von Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan, welches die Ausgangssubstanz für die Synthese von Serotonin darstellt sowie ebenfalls bei der Umwandlung von Tyrosin zu Dopamin. So führt ein BH₄-Synthese-Defekt häufig zu einem Mangel dieser Neurotransmitter. Des Weiteren kann dieser Defekt zu einer Akkumulation von abnormen Pterinen führen (Mayatepek, 2007).

Klinisch zeigen sich bei Patienten mit diesem Defekt Dys- und Hypokinesen, Dystonien und Chorea, infantile Parkinsonsyndrome, Hypotonie (Stamm) und Hypertonie (Extremitäten), okulogyre Krisen, Ptosis, Hypersalivation, Schlafstörungen und Störungen der Temperaturregulation. Diese Symptome werden bevorzugt durch den Mangel der Neurotransmitter Dopamin und Serotonin hervorgerufen als durch die erhöhten Phenylalaninkonzentrationen in Blut und Liquor (Mayatepek, 2007).

4.2.2.3 Weitere Unterteilung der Hyperphenylalaninämie

Von einer Hyperphenylalaninämie (HPA) wird gesprochen, wenn die Phenylalanin-Spiegel im Blut über dem physiologischen Bereich von 120 µmol/l und unter dem Bereich einer klassischen PKU von 1200 µmol/l liegen. Dabei differenziert man weiter in eine milde PKU mit Phenylalaninkonzentrationen im Plasma von 600-1200 µmol/l mit einer Restaktivität der PAH von 1-3 % und einer milden HPA mit einer Plasmakonzentration des Phenylalanins von 120-600 µmol/l mit einer Restaktivität der PAH von 3-10 %. Die Ursache sind Mutationen im PAH-Gen oder BH₄-Synthese-Defekte. Ab einem Phenylalanin-Spiegel von > 600 μmol/l wird eine Therapie eingeleitet (Mayatepek, 2007).

4.2.2.4 Maternale PKU

Eine maternale PKU ist eine Embryofetopathie, ausgelöst durch eine HPA in der Schwangerschaft. Die erhöhten mütterlichen Phenylalanin-Spiegel führen zu einer Schädigung des Embryos bzw. Fetus. Die Höhe der mütterlichen Phenylalaninkonzentration korreliert in diesem Zusammenhang mit dem Ausmaß der Schädigung. Während der Schwangerschaft ist die Rate an Komplikationen sowie Aborten und Todgeburten erhöht. Des Weiteren führen sie häufig zur mentalen Retardierung, wobei die IQ-Werte sich umgekehrt proportional zur mütterlichen Phenylalaninkonzentration während der Schwangerschaft verhalten. Weiter findet man eine Mikrozephalie, eine intrauterine Dystrophie und Herzfehler. Selten findet man auch Fehlbildungen wie Katarakte, Meningomyelozelen, Malrotationen und Syndaktylien (Mayatepek, 2007).

Die Phenylalanin-Toleranz ist höher, wenn der Fetus selbst Heterozygot und nicht Homozygot von der PKU betroffen ist. Denn die Leber der heterozygoten Feten besitzt selbst eine gewisse endogene PAH Aktivität und kann so in einem gewissen Grad die metabolische Situation der Mutter beeinflussen. Im dritten Trimenon jedoch sinkt die Toleranz des Feten, wenn er selbst Homozygot von der PKU betroffen ist (Kohlschütter et al., 2009).

Um dies zu verhindern, sollten Frauen mit dieser Erkrankung schon möglichst vor der Schwangerschaft eine strenge phenylalaninarme Diät beginnen. Die Phenylalanin-Spiegel im Plasma sollten dabei zwischen 120-360 µmol/l liegen (Mayatepek, 2007; Mitchell, 2013). Die Phenylalaninkonzentrationen sollten dabei während der Schwangerschaft wöchentlich bis zweiwöchentlich kontrolliert werden und von einer Ernährungsberatung begleitet sein (Mitchell, 2013). Denn es gilt, je eher die strenge Diät begonnen wird, desto besser ist das Outcome der Kinder bezüglich Kopfwachstum, motorischer und kognitiver Entwicklung (Cipcic-Schmidt et al., 1996). Bei Schwangeren, die einen Fetus mit PKU austragen, sollte besonders im dritten Trimenon eine strenge, engmaschige Kontrolle der Phenylalanin-Serumspiegel erfolgen (Kohlschütter et al., 2009).

Frauen, die Studien haben gezeigt, dass in der siebten bis achten Schwangerschaftswoche mit der phenylalaninarmen Diät begonnen hatten, Kinder mit einem normalen Längenwachstum, Geburtsgewicht, Kopfumfang und ohne Herzdefekt zur Welt brachten. Frauen, die die Diät erst später begonnen hatten, brachten Kinder mit einem geringeren Geburtsgewicht und einem kleineren Kopfumfang auf die Welt. Fünf der Kinder aus dieser Studie zeigten eine Mikrozephalie und eins einen Herzdefekt (Cipcic-Schmidt et al., 1996). Eine weitere Studie an 31 beobachteten Schwangerschaften ohne Diät zeigte bei 72 % eine mentale Retardierung, bei 12 % einen Herzdefekt und bei 55 % eine Mikrozephalie der entbundenen Kinder (Salize et al., 1991).

4.2.3 Genetik

Die Phenylketonurie ist ein autosomal-rezessiv vererbter Stoffwechseldefekt des Aminosäurenstoffwechels. Die Prävalenz liegt in Deutschland bei 1:5.022 (DGNS, 2012) und die Heterozygotenhäufigkeit bei 1:50. Das Gen für die PKU ist auf dem langen Arm des Chromosom 12 lokalisiert und erstreckt sich von den Bandenregionen 12q22-12q24. Das Gen ist etwa 90 kb groß und besitzt 13 Exons. Bisher sind über 400 verschiedene Mutationen, die eine klassische PKU verursachen können, entdeckt worden. Die meisten Mutationen liegen im Bereich der Exons 6 bis 12 (Buselmaier & Tariverdian, 2007). Mit 62 % ist die *missense* Mutation die häufigste Mutation, weiterhin findet man kleine Deletionen (13 %), Splice (11 %), *silent* (6 %) und *nonsense* (5 %) Mutationen, Insertionen (2 %) und Deletionen bzw. Duplikationen von ganzen Exonen (Mitchell, 2013). Die Phenotyp-Genotyp Korrelation ist stark heterogen. So findet man zum einen Geschwister mit der gleichen Mutation und einem unterschiedlichen klinischen und metabolischen Phänotyp und zum anderen Patienten mit einer Mutation, die typischerweise eine klassische PKU auslöst, jedoch keine Symptome zeigen (Mitchell, 2013).

4.2.4 Geschichte

Die Phenylketonurie wurde im Jahre 1934 als erste angeborene Stoffwechselerkrankung von Asbjørn Følling einem norwegischen Arzt und Chemiker anhand des Nachweises einer hohen Konzentration Phenylpyruvat im Urin von zwei mental retardierten Geschwister entdeckt und "Imbezillitas phenylpyruvica" genannt. Er untersuchte den Urin der Geschwister zwei Monate lang jeden zweiten Tag und bestätigte so sein Ergebnis. Daraufhin untersuchte er den Urin von 400 weiteren seiner Patienten und konnte die Phenylbrenztraubensäure bei acht weiteren im Urin nachweisen, wovon zwei Geschwisterpaare waren. Er stellte einige Gemeinsamkeiten zwischen den Patienten fest, so zeigten sie alle eine schwere mentale Retardierung, einen spastischen Gang, einen gebeugten Körper, breite Schultern, eine Neigung zu Ekzemen und eine helle Hautfarbe. Im gleichen Jahr publizierte er seine Ergebnisse in einem deutschen Journal (Følling, 1934; Christ, 2003).

Im Jahr 1937 nannte der Amerikaner Jervis die Erkrankung "phenylpyrouvic oligophrenia" (Jervis, 1937; Christ, 2003). Im gleichen Jahr gab der Engländer Lionel Penrose der Erkrankung ihren heutigen Namen "Phenylketonuria" (Penrose & Quastel, 1937; Christ, 2003). Jervis entschlüsselte den eigentlichen Enzymdefekt schließlich im Jahre 1947 (Jervis, 1953). Der deutsche Kinderarzt Horst Bickel entwickelte im Jahre 1952 das sensationelle Low-Phe Caseinhydrolysat (Schweitzer-Krantz & Burgard, 2000). Daraufhin entwickelte Bickel im Jahre 1953 die erste phenylalaninarme Diät.

Der Guthrietest wurde im Jahre 1963 von dem amerikanischen Mikrobiologen Robert Guthrie entwickelt und ermöglicht mittels Entnahme einiger Tropfen Blut aus der Ferse eines drei Tage alten Neugeborenen eine sichere Diagnose (Guthrie & Susi, 1963). Dieser findet auch heute noch im Rahmen des Neugeborenenscreenings Anwendung. Er wurde jedoch größtenteils durch die Tandem-Massenspektrometrie abgelöst, da er eine schlechte Spezifität auswies und alle primär positiv getesteten Patienten ein zweites Mal getestet werden mussten und unter Zuhilfenahme der Tandem-Massenspektrometrie gleich mehrere Stoffwechseluntersuchungen parallel durchgeführt werden können (Mitchell, 2013).

4.2.5 Diagnostik

Die PKU kann im Rahmen des Neugeborenenscreenings bereits am dritten Lebenstag durch die quantitative Bestimmung des Phenylalanins mittels Tandem-Massenspektrometrie diagnostiziert werden. Ein positiver Befund muss durch eine Aminosäurenanalyse bestätigt werden. Des Weiteren müssen sekundäre Ursachen für eine HPA wie z.B. schweres Leberversagen durch laborchemische und klinische Untersuchungen ausgeschlossen werden. Als nächstes folgt eine eindeutige Klassifikation der HPA, um die klassische von den BH₄-Synthese-Defekten zu differenzieren. Dafür werden die Pterine im Urin und Liguor und die biogenen Aminen im Liquor ermittelt und eine Aktivitätsmessung der Dihydropteridinreduktase im Trockenblut durchgeführt. Bei einer normwertigen Konzentration an Pterinen und einer physiologischen Aktivität der Dihydropteridinreduktase sollte eine Mutationsanalyse des PAH-Gens durchgeführt werden, um den genauen Genotyp zu bestimmen (s. Abb. 2) (Mayatepek, 2007). Die genaue Mutation kann man durch Mutations Scan (Locus spezifische Punktmutationen) (Bräutigam et al. 2003), eine Sequenzanalyse (Sequenzierung der 13 Exons Erfolgsrate > 99 %) oder einer Duplikations/Deletions-Analyse analysieren (Mitchell, 2013).

Ferner zählt ein BH₄-Belastungstest mit 20 mg BH₄/kg KG per os mit einer Messung der Phenylalaninkonzentration im Plasma vor Gabe sowie 2,4,8 und 24 Stunden nach Gabe zur Leitlinien konformen Diagnostik (Arbeitgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörung, 03/2010-03/2015). Bei einem starken Abfall (mind. 30 %) liegt meist ein BH₄-Synthese-Defekt vor (Mayatepek, 2007). Wobei zu beachten ist, dass es auch bei der klassischen PKU eine BH₄-abhängige Form gibt, bei welcher es durch die Gabe von BH₄ zu einer Senkung der Phenylalaninkonzentration im Serum kommt. Diesen Effekt bei der klassischen PKU erklärt man sich durch die Enzymstruktur. Denn das BH4 hemmt das PAH Tetramer und aktiviert das PAH Dimer, sodass das BH₄ zu einer Stabilisierung des mutanten PAH Dimers führt, wobei das PAH Tetramer die aktivere Form darstellt, jedoch bei Defekt des Tetramers durch das Dimer eine gewisse Aktivität vorhanden ist. Die Phenylalaninkonzentration im Serum kann so in einem gewissen Grad gesenkt werden (Steinfeld et al., 2003).



Leitlinien einer Abbildung 2: Schema konformen Konfirmationsdiagnostik zur bei Hyperphenylalaninämie im Rahmen des Neugeborenenscreenings. BH_4 (= Tetrahydrobiopterin), Phe cut off > 600 µmol/l, DHPR (= Dihydropteridin-Reduktase), MHP (= Milde Hyperphenylalaninämie), Phe (= Phenylalanin), PKU (= Phenylketonurie), (Arbeitgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörung, 03/2010-03/2015).

4.2.6 Therapie

Erforderlich für eine erfolgreiche Therapie ist ein früher Beginn einer strengen phenylalaninarmen Diät (Burgard et al., 1999; Schweitzer-Krantz & Burgard, 2000; Mayatepek, 2007). Die Behandlung sollte möglichst ab dem ersten Monat postpartal beginnen, um starke Beeinträchtigungen der kognitiven Entwicklung der Patienten zu vermeiden (Mayatepek, 2007). Des Weiteren ist das Outcome der Patienten von der Dauer der Behandlung als auch von dem durchschnittlichen Phenylalanin-Spiegel während der Behandlung abhängig (Burgard et al., 1999; Mayatepek, 2007). Eine Therapie wird bei Phenylalanin-Spiegeln von > 600 µmol/l eingeleitet (Mayatepek, 2007).

Die Aminosäure Phenylalanin ist eine essentielle Aminosäure, die dem Körper exogen zugeführt werden muss, sodass sie bei der Diät nicht vollständig aus der Nahrung entfernt werden darf. Sie wird entsprechend der individuellen Phenylalanin-Toleranz zugeführt. So bekommen die Säuglinge kleine Mengen Muttermilch bzw.

Säuglingsnahrung im Wechsel mit phenylalaninfreier Milch. Nach der Säuglingszeit eine weitestgehend vegetarische Diät mit Verzicht auf besonders muss eiweißreichen Nahrungsmitteln wie Fleisch, Fisch und Milchprodukten durchgeführt werden. Des Weiteren sollten Süßungsmittel wie Aspartam vermieden werden, die eine hohe Konzentration Phenylalanin enthalten (Mitchell, 2013). Die Patienten ernähren sich stattdessen mit eiweißarmen Spezialprodukten und Backwaren aus speziellem eiweißarmen Mehl. Die fehlenden Proteine werden durch Spezialprodukte, die aus einem phenylalaninfreien Aminosäurengemisch, Vitaminen, Mineralstoffen und Spurenelementen bestehen. zugeführt. Die Aminosäurensupplementierung sollte dabei im Säuglingsalter 3 g/kg/Tag mit einem Tyrosingehalt von 25 mg/kg/Tag und in der Kindheit 2 g/kg/Tag mit einem Tyrosingehalt von 25 mg/kg/Tag betragen (Mitchell, 2013).

Ziel der Diät sind folgende Phenyalaninkonzentrationen im Plasma:

- 1.-10. Lebensjahr: 42-240 µmol/l
- 11.-16. Lebensjahr : 42-900 µmol/l
- > 16. Lebensjahr : 42-1200 µmol/l

Die Phenylalaninkonzentrationen der Patienten müssen regelmäßig überwacht werden. Dies geschieht mit Hilfe von Kapillarblut auf Trockenblutkarten, die auch im Rahmen des Neugeborenenscreenings Anwendung finden. Diese Kontrollen erfolgen im ersten Lebensjahr wöchentlich, dann alle zwei Wochen und später monatlich (Burgard et al., 1999; Schweitzer-Krantz & Burgard, 2000; Mayatepek, 2007; Mitchell, 2013). Im Vergleich dazu haben die Briten das Therapieziel lebenslang eine phenylalaninarme Diät mit Phenylalaninkonzentrationen im Plasma von unter 700 µmol/l durchzuführen (Burgard et al., 1999). Die Franzosen führen nur über fünf Jahre eine strenge phenylalaninarme Diät durch, nach den fünf Jahren tolerieren sie Phenylalaninkonzentration bis zu 1500 µmol/l (Rey et al., 1996; Burgard et al., 1999; Schweitzer-Krantz & Burgard, 2000).

Patienten die unter einem BH₄-Synthese-Defekt leiden werden durch Substitution von BH₄ als auch durch die Neurotransmittervorstufen therapiert und können so teilweise auf eine Diät verzichten (Mayatepek, 2007). Des Weiteren kann auch bei Patienten, die unter einer klassischen PKU leiden, ein BH₄ Versuch unternommen werden. Die orale BH₄ Supplementierung kann bei Patienten mit BH₄-abhäniger PKU

als Monotherapie oder als Ergänzung zur phenylalaninarmen Diät genutzt werden (Steinfeld et al., 2003). Studien konnten bei alleiniger Therapie mit BH₄ Supplementierung bei einer milden PKU zeigen, dass sich die Kinder regelrecht entwickeln bei normalen Phenylalaninkonzentrationen im Serum, wobei man dem BH₄ keine Nebenwirkungen nachweisen konnte (Steinfeld et al., 2004). Jedoch zeigte sich, dass bei febrilen Infekten eine Dosiserhöhung des BH₄ erforderlich ist, da die Phenylalaninkonzentrationen im Serum sonst ansteigen (Steinfeld et al., 2004).

4.2.7 Veränderungen durch Phenylalanin im Gehirn

Die PKU ist kennzeichnend durch hohe Plasma- und Liquorspiegel der Aminosäure Phenylalanin und zeigt die Symptome der mentalen Retardierung, Mikrozephalie und Epilepsie. Der genaue Pathomechanismus dieser Erkrankung ist bisher noch weitgehend unklar. Jedoch hat man eine Reihe von Auffälligkeiten in Gehirnen von PKU Patienten als auch im Tiermodell nachweisen können, wobei die meisten Untersuchungen an postmortalen Gehirnen durchgeführt wurden.

Es konnte an postmortalen Gehirnen gezeigt werden, dass die Gehirne von Patienten mit unbehandelter PKU im Vergleich zu den Gehirnen von Gesunden im Durchschnitt 20 % kleiner waren und ein geringeres Gewicht aufwiesen (Bauman & Kemper, 1982; Huttenlocher, 2000).

Schon früh nach der biochemischen Aufklärung der PKU wurde bei Patienten mit unbehandelter PKU über Veränderungen der Myelinisierung und einer Gliose berichtet. Als Erster berichteten Alvord et al. (1950) von den Veränderungen des Myelins. Sie fanden in drei von fünf Fällen Veränderungen vor und am ausgedehntesten an einem 16 Monate alten Kleinkind. Dieses Kleinkind zeigte vor allem in den Bereichen die postnatal myelinisieren sowie im Rückenmark eine Blässe in der weißen Substanz. Auch einige andere berichteten über die Blässe der weißen Substanz und die Gliose in verschiedenen Bereichen des Zentralnervensystems (ZNS) (Sander, 1951, Crome & Pare, 1960, Crome, 1962, Bechar et al, 1965). Weiterhin zeigte das Gehirn eines 18-jährigen Patienten mit unbehandelter PKU eine milde Demyelinisierung und fibrilläre Gliose. Dabei waren die Orte der scheinbaren Demyelinisierung gleichzeitig auch die Orte der fibrillären Gliose. Diese Befunde lassen sich vorzugsweise den Leukodystrophien oder den cerebralen Lipidosen zuordnen (Poser & von Bogaert, 1959).

Jahrzehnte später weckte die Myelinisierungsstörung die Aufmerksamkeit von Baumann und Kemper, welche auch anhand von drei Gehirnen von erwachsenen Patienten mit unbehandelter PKU die Blässe des Myelins und die Gliose bestätigen konnten. Sie konnten es besonders in den Fasern des Balkens, den unspezifischen Thalamusfasern und der Formatio reticularis nachweisen. Die Myelinisierung insgesamt war vergleichbar mit dem Stadium eines zwei bis drei Jahre alten Kleinkindes (Bauman & Kemper, 1982).

Des Weiteren berichtete Benda über zwei 21-jährige Patienten mit unbehandelter PKU, die eine umfassende Demyelinisierung mit einer Anreicherung von Lipidabbauprodukten aufwiesen, was einer Degeneration der weißen Substanz entsprach (Benda, 1952). In einigen postmortalen Gehirnen von Patienten mit unbehandelter PKU konnte man schwammartige Veränderungen der weißen Substanz und eine freie Demyelinisierung nachweisen. Eine Korrelation zwischen der Schädigung der weißen Substanz und dem Grad der mentalen Retardierung war allerdings nicht evaluierbar (Huttenlocher, 2000).

Studien an Lebenden mittels MRT zeigten, dass Phe ein Leben lang schädlich für die Myelogenese ist, die Veränderungen der weißen Substanz sind reversibel und beeinflussen die Hirnareale der kurz und lang andauernden Myelinisation.

MRT Studien an Patienten mit einer früh behandelten PKU zeigten, je höher die aktuellen Phenylalanin-Spiegel im Blut waren, desto mehr Abnormalitäten der weißen Substanz konnte mittels MRT nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich keine Korrelation zwischen der Masse der Abnormalitäten der weißen Substanz und dem Zeitpunkt der Diagnosestellung, dem Beginn der Therapie oder dem IQ-Wert der Patienten. Des Weiteren konnte nach dreimonatiger strenger phenylalaninarmer Diät bei den Patienten mit vorher stark erhöhten Phenylalaninkonzentrationen und einigen Veränderungen der weißen Substanz ein Regress der Veränderungen der weißen Substanz im MRT nachgewiesen werden. Nur Patienten mit Phenylalaninkonzentrationen unter 360 µmol/l wiesen ein normales MRT auf (Bick et al., 1993).

23

Jedoch konnte ein deutlicher Vorteil einer lebenslangen Diät nicht klar herausgestellt werden. Die Bedeutung bzw. Auswirkung der Veränderungen der weißen Substanz sind weiterhin unklar (Möller et al., 2003).

Ein Hauptsymptom der unbehandelten PKU ist die Epilepsie, welche aber nicht durch Veränderungen der weißen Substanz, sondern durch Veränderungen der Neuronen im Kortex ausgelöst wird (Huttenlocher, 2000). So kann die Myelinsierungsstörung nicht allein für die Symptomatik der PKU ursächlich sein.

Histologische Untersuchungen an postmortalen Gehirnen von unbehandelten PKU Patienten ergaben, dass die Dichte der kortikalen Perikaryon der Neuronen in den von Bauman & Kemper (1982) untersuchten Gehirnen stark erhöht und vergleichbar mit Gehirnen der Kontrollgruppe im Alter von 6-24 Monaten waren. Jedoch zeigte sich, dass die einzelnen Neuronen kleiner waren und der Kortex insgesamt schmaler erschien. Die Dendriten waren weniger verzweigt und die Verzweigungen kürzer, genau wie die reduzierte Anzahl an synaptischen Spines nach Golgi-Färbung (Bauman & Kemper, 1982).

Andere histologische Untersuchungen an postmortalen Gehirnen von Patienten mit unbehandelter PKU ergaben auch eine Erhöhung der Perikaryondichte (Moser, 1995), einen Mangel an kortikalen Neuronen (Benda, 1952; Crome & Pare, 1960), eine Depigmentierung der Substantia nigra (Fellman, 1958), eine Reduktion der Dendritenlänge und eine Spine Dysgenese (Moser, 1995) sowie eine reduzierte Pyramidenschicht synaptische Spinesynapsendichte in der kortikalen (Williams et al., 1980).

Histologische Untersuchungen im Neokortex von Ratten, welche nach ihrer Geburt 21 Tage mit intraperitonialem p-Chlorophenylalanin behandelt wurden, zeigten eine Verminderung der basalen Dendritenbäume und langen Pyramidenzellen in Anzahl und Größe. Die basalen dendritischen Zellen wiesen im Durchschnitt nur knapp die Hälfte des Volumens der Kontrollgruppe auf. Ebenfalls verzeichneten die Reifungsprozesse und die Organisation der kortikalen Neurone eine Modifikation (Cordero et al., 1983).

Die Hippocampi von Ratten, denen ab dem zweiten Lebenstag Phenylacetat injiziert wurde, wiesen bei der Untersuchung im Alter von 60 Tagen im Stratum radiatum der CA1 Region eine erhöhte Spinesanzahl auf. Die Spines stellten sich als dünn und lang dar und nicht wie in diesem Alter erwartet kurz und stämmig. Die Bildung dieser Spines erfolgt vorrangig im 2. Trimenon und können nur abgeschwächte synaptische Potentiale übertragen, sodass die afferenten Fasern im Stratum radiatum gestört sein könnten (Lacey, 1984).

Weiterhin zeigt auch die Neurochemie bei Patienten mit unbehandelter PKU Auffälligkeiten. Durch die hohe Phenylalaninkonzentration im Liquor kommt es zu einem Mangel der Monoamin-Neurotransmitter. Die Monoamine benötigen für ihre Synthese die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan. Zu den Monoamin-Neurotransmittern gehören Dopamin, Serotonin und Noradrenalin. Bei PKU Patienten mit hohen Phenylalaninkonzentrationen konnte eine Hemmung der Expression von Dopaminrezeptoren mittels PET-Scan nachgewiesen werden (Paans et al., 1996).

Des Weiteren kommt es durch die hohen Phenylalanin-Spiegel zu einem relativen Mangel an Tyrosin und Tryptophan, da hohe Phenylalanin-Spiegel den Transporter, der die langen neutralen Aminosäuren über die Blut-Hirnschranke transportiert, kompetitiv hemmen (McKean et al., 1968; Paans et al., 1996; Pardridge, 1998; Surtees & Blau, 2000). Vergleicht PKU Patienten man mit mit PKU Phenylalaninkonzentrationen von über 700 µmol/l Patienten mit Phenylalaninkonzentrationen im therapeutischen Bereich, so kann man mittels PET-Scan eine Erniedrigung des Tyrosins bei den PKU Patienten über dem therapeutischen Bereich nachweisen (Paans et al., 1996). Der Mangel an Monoaminen wurde weiterhin durch die Ausscheidung der Metaboliten im Urin (Curtius et al., 1972) und die Konzentration im Liquor (Butler et al., 1981; Lykkelund et al. C, 1988) gezeigt. So kommt es auch durch die kompetitive Hemmung des Transporters zu einem Mangel an anderen langen neutralen Aminosäuren wie Valin oder Isoleucin. Dies führt zu einer reduzierten Proteinbiosynthese im Gehirn und seinerseits zu einer Unterernährung der Zellen im Gehirn mit daraus folgend geringerer Zellzahl und Gewicht des Gehirns (Surtees & Blau, 2000).

Untersuchungen an Rezeptoren in hippocampalen Rattenkulturen zeigten veränderte Aktivitäten der Rezeptoren. Der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR), der als Glutamatrezeptor wesentlich an der Gedächtnisbildung und Lernprozessen involviert ist und so zur synaptischen Plastizität beiträgt, wurde bei hohen Phenylalaninkonzentrationen untersucht. Es wurde dargelegt, dass der NMDAR durch Phe allosterisch über die Glycinbindungsstelle gehemmt wird. Dieser Effekt war durch Auswaschung reversibel. Auf den α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (acid) Rezeptor (AMPAR) einem weiteren Glutamatrezeptor, der eine wichtige Rolle in der synaptischen Plastizität spielt, zeigte Phe keine Wirkung (Glushakov et al., 2002). Untersuchungen von Ionenströmen der exzitatorischen postsynaptischen Potenzialen (EPSPs) wiesen bei hoher L-Phenylalaninkonzentration in hippocampalen neuronalen Rattenkulturen eine Hemmung auf. Man vermutet einerseits eine Hemmung der Freisetzung von Glutamat aus dem präsynaptischen Bouton oder einen Wettbewerb um die NMDARs Glycin-Bindungsstelle oder andererseits eine Konkurrenz um die Glutamat-Bindungsstelle an Non-NMDARs. Untersuchungen an v-Aminobuttersäure-Rezeptorvermittelte (GABAR) inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs) zeigten keinen Effekt. Das D-Phe wies auch viel schwächere Effekte auf (Glushakov et al., 2003). Langfristige Veränderungen der EPSP konnten an der PAH^{enu2}-Maus im Alter von 6-10 Wochen gezeigt werden.

Die Epilepsie, welche bei der PKU ein Leitsymptom darstellt, könnte durch die nachgewiesen Rezeptorveränderungen erklärt werden, denn durch chronisch erhöhte Phenylalaninkonzentrationen konnte ein Anstieg von Glutamatrezeptoren nachgewiesen werden (Glushakov et al., 2005).

4.3 Anatomie des Hippocampus

4.3.1 Lage und Aufbau des humanen Hippocampus

Die Experimente dieser Arbeit wurden am Hippocampus durchgeführt, da er als Teil des limbischen Systems entscheidend an Verhaltens- und Denkprozessen sowie an der Beeinflussung von emotionalen Äußerungen, Lernprozessen und der Gedächtnisbildung beteiligt ist. Patienten, die unter einer unbehandelten PKU leiden, zeigen als führendes Symptom die mentale Retardierung, welche durch Störung des Lernverhaltens und der Denkprozesse gekennzeichnet ist.

Der Hippocampus ist eine paarige Struktur des Großhirns. Er nimmt den Hauptteil des Allokortex ein und zählt phylogenetisch zu den ältesten Strukturen des Wirbeltiergehirns. Der Hippocampus ist dabei entscheidend am Prozess der Gedächnisbildung als auch des Lernens involviert. Nach Entfernung des Hippocampus ist die Fähigkeit Neues zu erlernen und das Kurzzeitgedächtnis stark beeinträchtigt, jedoch zeigt das Langzeitgedächtnis keine Beeinträchtigung.

Das limbische System setzt sich zum einem aus dem Hippocampus und den Regionen, welche durch die Area entorhinalis Zugang zu ihm haben, und zum anderen aus dem Septum, dem Gyrus cinguli, Teile der Amygdala, dem rostralen Thalamus (Nucl. anterior thalami), Teile des Epithalamus (Nucl. habenulae) und Hypothalamus (Corpus mamillare), des Mittelhirns (Nucl. interpeduncularis) und der Formatio reticularis zusammen (Zilles & Rehkämper, 1998).

Der Hippocampus ist an der medialen Wand des Seitenventrikels im Temporallappen lokalisiert (s. Abb. 3). Er kann in drei Teile gegliedert werden: In den Hippocampus supracommissuralis, welcher unter dem Splenium corporis callosi in den Gyrus fasciolaris übergeht und dorsal auf das Corpus callosum zieht, in den Hippocampus praecommissuralis, welcher unter dem Rostrum corporis callosi endet und letztlich den Hippocampus retrocommissuralis. Dieser befindet sich im Gyrus dentatus und dem medialen Teil des Gyrus parahippocampalis und grenzt lateral im Gyrus parahippocampalis an die periarchikortikalen Gebiete des Praesubiculums, welche in das Parasubiculum übergehen und lateral von der Area entorhinalis umgeben sind. Der Hippocampus bildet gemeinsam mit der Area entorhinalis des Gyrus parahippocampalis die Hippocampusformation. Der Hippocampus retrocommissuralis weist beim Menschen die stärkste strukturelle Differenzierung auf (Zilles & Rehkämper, 1998).



Abbildung 3: Medianansicht des menschlichen Gehirns mit den wichtigsten limbischen Zentren. Rot markiert die Lage des Hippocampus (Roth, 2001).

Der Hippocampus setzt sich aus dem Subiculum, dem Cornu ammonis (Ammonshorn) und dem Gyrus dentatus zusammen (s. Abb. 4). Das Cornu ammonis kann in die Regionen CA1-CA3 gegliedert werden und ist die zellreichste Schicht des Hippocampus. Histologisch ist der Hippocampus als Teil des Allokortex anders als der sechsschichtige Isokortex nur dreischichtig aufgebaut. Das Cornu ammonis und das Subiculum weisen als oberflächlichste Schicht das Stratum radiatum-lacunosummoleculare auf, welches die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen beinhaltet. Die mittlere Schicht stellt das Stratum pyramidale dar, das über die Somata der Pyramidenzellen verfügt (Zilles & Rehkämper, 1998). Die tiefste Schicht das Stratum oriens besteht aus den basalen Dendriten der Pyramidenzellen.

Der Gyrus dentatus stellt die Eingangsebene der Hippocampusformation dar (Rohen, 2001) und ist histologisch auch in drei Schichten gegliedert. Die oberflächlichste Schicht das Stratum moleculare besteht aus den Dendriten der Körnerzellen. Die mittlere Schicht das Stratum granulosum beinhaltet die Somata der Körnerzellen und die tiefste Schicht das Stratum multiforme die basalen Dendriten der Körnerzellen (Zilles & Rehkämper, 1998).



Abbildung 4: Histologischer Aufbau und Faserverbindungen des Hippocampus. DG (= Gyrus dentatus), CA1-CA3 (= Cornu ammonis). Schichten des Cornu ammonis von basal nach apikal: Stratum oriens, Stratum pyramidale, Stratum radiatum und Stratum lacunosummoleculare (wobei diese Schichten auch als Stratum radiatum-lacunosum-moleculare zusammengefasst werden können). Schichten des Gyrus dentatus von apikal nach basal: Stratum moleculare, Stratum granulosum und Stratum multiforme. Weiter zu sehen Alveus, Hilus und wichtige Afferenzen und Efferenzen.

http://www.uni-leipzig.de/~vetana/Hippocampus/hippocampus.html.

4.3.2 Aufbau und Lage des Mäusehippocampus

In der Maus, an der die Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurden, wird die Region des Hippocampus in die Hippocampusformation und die parahippocampale Region unterteilt. Die Hippocampusformation wird in drei Teile, den Gyrus dentatus, den Hippocampus mit den Regionen CA1-CA3 und das Subiculum, welche alle dem dreischichtigen Allokortex angehören, gegliedert. Die parahippocampale Region wird in fünf Teile, den perirhinalen, entorhinalen und postrhinalen Kortex, das Präsubiculum und das Parasubiculum aufgeliedert. Der Hippocampus erscheint als längliche Struktur.

Die lange Achse ist kommaförmig und reicht von den Septalkernen des basalen Vorderhirns rostrodorsal über und hinter das Dienzephalon bis in den caudaventralen Teil des Temporallappens. Die Krümmung des Hippocampus fällt im Vergleich zum Hippocampus der Ratten geringer aus, da die rostrale Ausdehnung an der ventralen Spitze in geringerem Maß ausgeprägt ist (Witter, 2012).

4.3.3 Neuronale Verschaltung des Hippocampus

Die afferenten Bahnen erreichen den Hippocampus einerseits aus dem Septum über den Fornix und andererseits erreichen ihn Afferenzen aus den angrenzenden Rindengebieten des Frontal- und Temporallappens über die Area entorhinalis sowie vom rostralen Hirnstamm, dem Hypothalamus und dem Thalamus (Rohen, 2001). Des Weiteren ziehen Afferenzen für das olfaktorische System aus der Regio praepiriformis über das Subiculum zur CA1 Region und zur Area entorhinalis (Zilles & Rehkämper, 1998).

Die Hauptafferenzen stammen aus dem entorhinalen Kortex, sie ziehen als Tractus perforans zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus und bilden dort die erste Synapse der trisynaptischen intrahippocampalen Verschaltung (s. Abb. 5). Die Körnerzellen senden ihre als Moosfasern bezeichneten Axone zu den Pyramidenzellen der Region CA3. Die Moosfasern enden im Stratum lucidum, eine zwischen dem Strata pyramidale und radiatum auf die CA3 Region begrenzte Schicht, und treffen hier auf die zweite Synapse. Die Axone der CA3 Region ziehen zum einen als Schaffer-Kollateralen zu den Pyramidenzellen der CA1 Region, um hier auf die dritte Synapse zu treffen und zum anderen zum kontralateralen Hippocampus, um eine kommissurale Verbindung zwischen den Hippocampi beider Seiten zu bilden. Die Pyramidenzellen der CA1 Region sind in der Lage bei wiederholter, tetanischer Reizung das Phänomen der Langzeitpotenzierung zu zeigen, welche wichtig für die Gedächtnisfunktion des Hippocampus ist. Von den Pyramidenzellen der CA1 Region erfolgt nun die Projektion zum Subiculum, das den Übergang zwischen dem dreischichtigen Allokortex zum sechsschichtigen Isokortex bildet. Dort sammeln sich die Fasern, um den Hippocampus über den Fornix zu verlassen.



Abbildung 5: Intrahippocampale Verschaltung mit TP (= Tractus perforans), MF (= Moosfasern), SC (= Schafferkollaterale), AC (= Kontralaterale Fasern) und Aufbau des Hippocampus mit DG (= Gyrus dentatus), CA1 / CA3 Region des Cornu ammonis, Sb (= Subiculum) und afferente und efferente Bahnen (rote Pfeile). http://neuropsychoanalyse2012.wordpress.com/2008/02.

Wichtige efferente Verbindungen sind hier die vom Subiculum ausgehenden Corpus Efferenzen, die zum mamillare. zur Area entorhinalis. Corpus amygdaloideum und zum Temporallappen führen. Störungen in diesen Bahnen können zu schweren Defiziten des Kurzzeitgedächtnisses führen (Rohen, 2001). Vom Corpus mamillare zieht dann der Tractus mamillothalamicus als Vicg-d'Azyr-Bündel zum Nucl. anterior des Thalamus. Durch den Gyrus cinguli gelangen die Informationen wieder zurück in den Hippocampus. Dies wird als Papez-Neuronen-Kreis bezeichnet. Weitere Efferenzen des Hippocampus führen über den praekomissuralen Fornix zum Septum.

In dieser Arbeit wurde jeweils in der Region CA1 und CA3 des Cornu ammonis das Stratum radiatum und somit die zweite bzw. dritte intrahippocampale Verschaltung an den apikalen Dendriten der Pyramidenzellen untersucht.

4.4 Aufbau und Funktionen von Synapsen

Das Zentralnervensystem besteht aus Gliazellen und Neuronen. Ein Neuron setzt sich vereinfacht aus einem Perikaryon (Soma), einem Axon und mehreren Dendriten zusammen, dabei leiten die Dendriten die afferente Erregung zum Perikaryon hin und die Axone efferent vom Perikaryon weg. Je nach Anzahl der Fortsätze kann in uni-, bi-, pseudo- oder multipolare Neuronen unterschieden werden. Die Dendriten verzweigen sich in ihrem weiteren Verlauf oft zu immer dünner werdenden Dendritenbäumen, welche Spines (Dornen) tragen können (Zilles & Rehkämper, 1998).

Die Axone beginnen am Axonhügel des Perikaryon, können Kollaterale abgegeben und zweigen sich letztendlich zu Telodendronen auf. Die Axonterminale bildet dabei eine Auftreibung, die *boutons* genannt werden und den präsynaptischen Teil einer Synapse bilden (Rohen, 2001).

Synapsen sind neuronale Kontaktstellen und dienen dem Informationsaustausch der Neuronen. Synapsen können primär in elektrisch und chemisch unterteilt werden.

Die elektrischen Synapsen stellen neuronale Verbindungen über Gap junctions dar, wobei der Interzellularspalt schmal und die zytoplasmatische Verbindung über Connexine erfolgt. Sie ermöglichen eine Erregungsweiterleitung ohne Zeitverlust (elektrotonische Koppelung) und sind außer in den Haarzellen des Innenohrs und den Rezeptorzellen der Retina beim Menschen selten zu finden.

Die chemische Synapse setzt sich aus der postsynaptischen Dichte / Membran, dem synaptischen Spalt und dem präsynaptischen axonalen Bouton mit den Vesikel zusammen (s. Abb. 6). Die postsynaptische Dichte ist etwa 50 nm breit und befindet sich auf der Zytoplasmaseite der postsynaptischen Membran. Der synaptische Spalt befindet sich extrazellulär zwischen der prä- und postsynaptischen Membran und hat eine Breite von 20-30 nm. Die Differenzierung der Synapsen kann anhand ihrer Verknüpfung in axodendritische, axosomatische, axoaxonale und dendrodendritische Synapsen erfolgen (Kahle, 2001). Die präsynaptische Struktur, die am Ende eines Axon durch den Bouton gebildet wird, enthält viele Mitochondrien und Vesikel. Die Vesikel beinhalten die Neurotransmitter, wobei ovale bis polymorphe Vesikel typisch für inhibitorische und runde, helle Vesikel typisch für exzitatorische Synapsen sind. Des Weiteren findet man noch Vesikel mit dunklem Zentrum *Dense-core*-Vesikel, welche oft Katecholamine oder Indolamine enthalten können (Nimchinsky et al., 2002).



Abbildung 6: Elektronenmikroskopisches Bild einer Gray I-Synapse. Ausschnitt aus einer 35 Wochen KO Aufnahme. Gekennzeichnet sind beispielshaft präsynaptische Vesikel, die präsynaptische Membran, der synaptische Spalt und die postsynaptische Dichte. Der Maßstab ist in der linken unteren Ecke angegeben.

Es gibt zwei Synapsentypen Gray I und Gray II Synapsen.

Die Gray I Synapsen sind die asymmetrischen exzitatorischen Synapsen, da die postsynaptische Membran stärker verdickt ist als die präsynaptische und man vor allem helle runde Vesikel, welche Glutamat und Acetylcholin enthalten, findet. Der synaptische Spalt ist hier 30 nm breit. Die postsynaptische Dichte ist membranassoziiert aus Material mit einer hohen Elektronendichte. Sie besteht aus Rezeptoren, Kanälen und Signalsystemen, die an der synaptischen Übertragung und der Koppelung der synaptischen Aktivität beteiligt sind (Nimchinsky et al., 2002). Beim Mangel der postsynaptischen Dichte und gleicher Dicke der prä- und postsynaptischer Dichte spricht man von einer symmetrischen Synapse und wenn sie dann eiförmige Vesikel in der Präsynapse besitzt, spricht man von einer *nonglutamatergic* Synapse vom Typ Gray II (Nimchinsky et al., 2002). Die Gray II Synapsen sind häufig inhibitorisch und können auch *Dense-core*-Vesikel enthalten. Der synaptische Spalt ist hier mit einer Breite von 20 nm schmaler als bei der Gray I Synapse.

Spines sind postsynaptische Strukturen, die die Versprossung der Dendriten darstellen, das menschliche Gehirn besitzt > 10¹³ Spines. Sie sind membranöse Vorsprünge auf den neuronalen Oberflächen und typisch für exzitatorische Synapsen, mehr als 90 % der exzitatorischen postsynaptischen Potenziale (EPSP) enden an diesen Spines. Viele Dysfunktionen des Gehirns korrelieren mit anormalen dendritischen Spines. Die Spines der Pyramidenzellen des Hippocampus haben ein

Durchschnittsvolumen von 0,062 µm³ (Harris & Stevens, 1989). Das Volumen der Spines ist in allen Gehirngebieten proportional zu der Fläche der postsynaptischen Dichte (Harris & Kater, 1994). Sie sind maßgeblich für die synaptische Plastizität und so auf eine schnelle hohe Ca²⁺-Amplitude spezialisiert. Spines bestehen aus einem Kopf mit einem Volumen von circa 0,001-1 µm³, welcher mit dem Neuron über einen dünnen Hals mit einem Durchmesser von circa < 0,1 µm verbunden ist. Auftreten können sie sowohl am Perikaryon als auch an Dendriten oder dem Axonhügel. Die Neurotransmitter konzentrieren sich dabei auf die Oberfläche der Spines an der präsynaptischen Membran. Aktinfilamente findet man innerhalb der Spines, die Mitochondrien und Mikrotubuli befinden sich außerhalb der Spines. Der Golgiapparat befindet sich vor allem im Perikaryon und den proximalen Dendriten, so findet man im Spine stattdessen den Spineapparat mit Kontakt zum glatten endoplasmatischen Retikulum (Harris & Kater, 1994). Sie machen 10-20 % des kompletten Spinevolumens aus (Harris & Stevens, 1988). Unreife Spines fallen dadurch auf, dass sie keinen gut entwickelten Spineapparat vorweisen (Harris et al., 1992).

Spines können durch das Aussehen ihres Kopfes und Halses klassifiziert werden. Spines mit großem Kopf und engen Hals werden als *mushroom* Spines gekennzeichnet. Weisen sie einen kleinen Kopf und engen Hals auf, spricht man von *thin* (dünnen) Spines. Haben die Spines keinen Hals, spricht man von *stubby* (stoppelig) Spines, *branched* (verzweigte) Spines weisen mehr als eine postsynaptische Dichte auf (Peters & Kaiserman-Abramof, 1970).

Die einzelnen Spinetypen verändern sich im Laufe der Entwicklung, so findet man in der frühen ZNS-Entwicklung vor allem *stubby* Spines, welche oft sehr groß sind und weiter findet man zahlreiche Filopodien, membranöse Ausstülpungen der Dendriten, die in der Lage sind, sich freibeweglich zu einem Spine weiterentwickeln zu können. In der weiteren Entwicklung nimmt die Größe der Spines und die Anzahl der Filopodien ab und man findet besonders *mushroom* Spines (Nimchinsky et al., 2002).

4.5 <u>Die Pah^{enu2}-Maus</u>

Ich verwendete für meine Experimente das von Shedlosky et al. (1993) entwickelte Mausmodel. Zuerst stellten dafür McDonald et al. (1990) eine Mutante durch das alkalische Agens N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff her. Dieses induziert Mutationen in der Mauskeimbahn mit einer Frequenz von 10⁻³ pro Genlocus. Sie isolierten aus 337 Gameten 4 Mutanten mit einer Hyperphenylalaninämie (HPH). Eine von ihnen, die HPH-5, zeigte einen PAH-Mangel in der Leber, woraufhin sie die PAH-Aktivität durch die Phenylalanin-abhängige NADH-Oxidation in Gegenwart von q-Dihydropteridinreduktase (q-DHPR) maßen. Die HPH-5 Mutanten weisen im Vergleich zum Wildtyp bei intraperitonealer Injektion von Phe einen stärkeren Anstieg von Phe im Serum auf, der langfristig auf einem hohen Spiegel bleibt, bis er sich wieder normalisiert.

Shedlosky et al. (1993) entwickelten im Weiteren aus BTBR-Mäusen durch das chemische Mutagen Ethylnitrosourea (Enu) die Pah^{enu}-Maus. Hierzu behandelten sie BTBR-Maus Männchen mit dem Ziel einer Keimbahnmutation mit Enu und kreuzten sie mit normalen BTBR-Maus Weibchen. Dies wiederholten Sie 350-mal. Nun erhielt man homozygote Pah^{enu1} Neugeborene, welche einen schwach positiven Guthrietest aufwiesen. Anschließend isolierten sie zwei neue Allele das Pah^{enu2} und Pah^{enu3}. Mäuse zeigten einen ausgeprägteren Phänotyp. Diese Die Phenylalaninkonzentration war bei diesen sowohl im Serum als auch im Urin stark erhöht. Nun produzierten sie doppelte heterozygote Mäuse, indem sie die verschiedenen Mutanten untereinander kreuzten. Die Pah^{enu2}-Mäuse wiesen dabei die geringste Leber PAH Aktivität auf. Man konnte jedoch bei allen Typen RNA isolieren. So war die RNA Konzentration im Vergleich zum Wildtyp bei den Pah^{enu1}-Mäusen normal, die Pah^{enu2}-Mäuse zeigten eine um 1 % gesenkte RNA Konzentration und die Pah^{enu3}-Mäuse um 10 %. Des Weiteren verglichen sie homozygote Mäuse mit ihren heterozygoten Geschwistern.

Es zeigte sich, dass die Pah^{enu2/3} langsamer wuchsen und kleinere Köpfe hatten. Verhaltensauffälligkeiten begannen in der zweiten Lebenswoche und reichten bis ins Erwachsenenalter. Ab der zweiten Lebenswoche fiel eine Hypopigmentation auf, die dann ab der fünften bzw. sechsten Lebenswoche stagnierte (s. Abb. 7). Letztlich beobachteten sie eine abnorme ZNS Entwicklung.

35



Abbildung 7: Fotoaufnahme zum beispielhaften Vergleich einer adulten Pah^{enu2} (KO)-Maus und einer adulten Wildtyp C57/BI6 (WT)-Maus aus unserer Zucht mit rot markiert. Auffällig das hellere Fell der KO-Maus. Arbeitsgruppe Rune, Hamburg 2012.

Eine genaue Charakterisierung der Pah^{enu2} Mutanten erwies, dass sie einen stark ausgebildeten Phänotyp aufwiesen. Bei der Genotypisierung stellte sich auf der Nucleotidposition 835 im Exon 7 des PAH-Gens eine Transition von Thymin zu Cytosin heraus (Buselmaier & Tariverdian, 2007). Dabei wurde auf dem Codon 263 die Aminosäure Phenylalanin durch die Aminosäure Serin ausgetauscht (*missense* Mutation) (TTC \rightarrow TCC), welches im aktiven Zentrum des Enzyms liegt. Diese Mutation ist auch bei humaner PKU einer der häufigsten Orte von *missense* Mutationen, wobei dort die Aminosäure Phenylalanin durch die Aminosäure Leucin ausgetauscht wird. Zur schnelleren Genotypisierung setzt man das Alw26I ein, das genau in der Nucleotidsequenz 831-835 ansetzt und beim Wildtyp Fragmente mit einer Basenpaarlänge von 82 und 50 zeigt und beim Heterozygoten Fragmente mit 82, 50, 48 und 34 Basenpaarlänge (McDonald & Charlton, 1997).

Die BTBR-Pah^{enu2} PKU-Mauslinie hat durch Charakterisierung den Rang für das Model der menschlichen PKU erhalten. Dies bewiesen Studien über die Genetik, Biochemie und den Phänotyp (McDonald et al., 2002).

Puglisi-Allegra et al. (2000) untersuchten Pah^{enu2}-Mäuse nach vorheriger Genotypisierung mit Hilfe des Easy DNA Kit im Alter von 8-10 Wochen und fanden Defizite in der Neurochemie. Sie untersuchten die Metaboliten 3-4-Dihydroxyphenylaceticacid (DOPAC) (Dihydroxyphenylessigsäure), Homovanillic acid (HVA) (Homovanillinsäure) und 3-Methoxytyramin (3-MT);
3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol (MHPG) und 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) (5-Hydroxyindolessigsäure) des Katecholaminsystem (Dopamin/Noradrenalin) und des Indolaminsystem (Serotonin). 5-Hydroxytryptamin (5-HT) und Metaboliten des Serotonins waren in allen Hirnregionen vermindert, sodass durch diese Surrogatparameter auf ein Serotonindefizit geschlossen wurde. Der Gyrus cingulum, Hippocampus, präfrontaler Kortex und die Amygdala zeigten eine signifikant erniedrigte Konzentration von Noradrenalin. In allen anderen Hirngebieten war der Noradrenalin Metabolit 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) signifikant verändert. Dopamin und seine Metaboliten DOPAC und HVA im präfrontalen Kortex. Amyqdala, Nucleus accumbens waren und im Caudatus/Putamen signifikant erniedrigt. Im Caudatus/Putamen und im Nucleus accumbens waren außerdem noch die 3-MT-Konzentrationen erniedrigt.

Dyer et al., (1996) zeigten in diesem Mausmodel, die für die humane PKU typische Hypomyelinisierung.

Verhaltensanalysen des Mausmodels zeigten keinen Anhalt für schwere kognitive Defizite (Zagreda et al., 1999; Mihalick et al., 2000). Jedoch fanden Cabib et al. (2003) kognitive Defizite mit Hilfe des Spatial Novelty Test (SNT) und des Objects Recognition Test (ORT), der räumliche und nicht räumliche Informationsverarbeitung der Mäuse testete. Die homozygoten PKU Mutanten fielen bei beiden Tests im Vergleich zu den heterozygoten Kontrollgruppen (C57/BL/6 und DBA/2) durch, was auf eine Intelligenzminderung hindeutete. Sie zeigten dabei aber keine Defizite in der Motorik oder eine vermehrte Ängstlichkeit.

Studien am Proteom der PKU-Mäuse bei gemischtem Alter und Geschlecht zeigten, dass bei den PKU-Mäusen Proteine entdeckt wurden, die der Wildtyp nicht aufwies. Diese Proteine wurden auch schon bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Demenz oder dem Down-Syndrom entdeckt (McDonald et al., 2002).

Des Weiteren konnten Sarkissian et al. (2000) an der BTBR-Pah^{enu2}-Maus eine Senkung der Phenylalaninkonzentration im Serum durch eine orale Enzymsubstitutionstherapie mit *Phe Ammonia Lyase* (PAL) erreichen (McDonald et al., 2002).

4.6 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Ziel meiner Dissertation ist, den zerebralen Phänotyp der Pah^{enu2}-Maus, welche als anerkanntes Modell der humanen PKU angesehen ist, anhand von morphologischen Kriterien zu charakterisieren. Die Analysen werden an der von Shedlovsky et al. (1993) etablierten Pah^{enu2}-Maus durchgeführt. Es soll untersucht werden, welchen Einfluss die pathologische Erhöhung der Serum- und Liquorspiegel der Aminosäure Phenylalanin auf die Zahl der Spinesynapsen in der CA1 und CA3 Region des Hippocampus hat. Schwerpunkt der Arbeit ist dabei die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Genese von Spinesynapsen während der postnatalen Entwicklung des Gehirns.

Untersucht wird die Fragestellung: Welchen Einfluss hat der postnatale pathologische Anstieg der Aminosäure Phenylalanin im PKU-Modell auf die Entwicklung der Spinesynapsenzahl im Hippocampus der Pah^{enu2}-Maus bei den Altersstufen zwei Wochen, drei Wochen, vier Wochen, acht Wochen, zwölf Wochen und 35 Wochen?

5 Material

5.1 <u>Arbeitsmaterial und Geräte</u>

Brutschrank 68 °C	MEMMERT
Chirurgisches Besteck	FINE SCIENCE TOOLS
Deckgläser 20 x 46 mm	MARIENFELD
Desinfektionsmittel (Sterilium)	BODE
Diamantmesser (Diatom)	H.C. GROSSE
Dispensette (2 ml / 10 ml)	BRAND
Einmalkanüle	BRAUN
Einmalhandschuhe	HARTMANN
Einmalskalpell	BRAUN
Einmalspritze 1ml	BRAUN
Elektronenmikroskop MC 100	PHILIPS
Eukobrom SW Papierentwickler	TETENAL
Fotopapier Nr. 3, DIN A4	TETENAL
Heidemannspatel	AESCULAP DE
Heizplatte	W. PFENNING
Klinge (Pilling Weck Surgical Wecprep)	PREPBLADES
Kühlschrank	ELEKTROLUX / LIEBHERR
Lichtmikroskop	OLYMPUS / ZEISS
Negativentwickler	KODAK
Objektträger Super Frost / Plus	ASSISTENT
Perfusionspumpe Masterflex [®]	COLE PARMER
Pipetten, verschiedene Größen	EPPENDORF AG
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	EPPENDORF AG
Schere	FINE SCIENCE TOOLS
Staubsauger	NILFISK
Stereolupe (Stemi DV 4)	ZEISS
Supercut (Stereo-Star)	REICHERT-JUNG
Tellerschleifgerät	PROXXON
Ultramicrotom	REICHERT-JUNG
Waage	METTLER

5.2 <u>Software</u>

Adobe Reader 10.0 deutsch	ADOBE
Excel 2007	MICROSOFT
Powerpoint 2007	MICROSOFT
Windows Vista	MICROSOFT
Word 2007	MICROSOFT

5.3 <u>Chemikalien</u>

2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol, 2 %	SERVA
Aceton	MERCK
Aqua ad iniectabilia	BAXTER HEALTHCARE SA
Aqua dest.	IONENAUSTAUSCHER UKE
Blei-2-citrat	MERCK
2-Dodecenylsuccinicacidanhydrid	SERVA
(DDSA)	
Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat	MERCK
Ethanol absolut	SIGMA-ALDRICH
Ethanol, 96 %	MERCK
Glutaraldehydlösung, 25 %	MERCK
Glycidether	SERVA
Ketamin	ALBRECHT GMBH
Methylnadicanhydrid (MNA)	SERVA
Natriumchlorid, 0,9 %	MERCK
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	MERCK
Natriumtetraborat	MERCK
Natronlauge 1 M	MERCK
Osmiumtetroxid, 1 %	ROTH
Propylenoxid	SERVA
Saccharose	MERCK
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	MERCK
Toluidinblau	MERCK
Uranylacetat	MERCK

Xylazin (Rompun[®])

BAYER

5.4 <u>Lösungen</u>

Phosphatpuffer 0,1 M

50 ml 0,2 M Natriumdihydrogenphosphatlösung (NaH₂PO₄) wurden zusammen mit 10 ml 0,5 M Di-Natriumhydrogenphosphatlösung (Na₂HPO₄) in 40 ml Aqua dest. gemischt und mit Hilfe von 1 M Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Phosphatpuffer 0,2 M

5,52 g Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (NaH₂PO₄ x H₂O) wurden zusammen mit 42,88 g Di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat (Na₂HPO₄ x 7 H₂O) in 1000 ml Aqua dest. gelöst und mit Hilfe von 1 M Natronlauge auf einen pH-Wert 7,4 eingestellt.

Intraperitoneale anästhetische Injektionslösung

Zur Herstellung von 10 ml der Injektionslösung wurden 0,625 ml Xylazin-Lösung (Rompun[®]) (20 mg/ml) und 1,25 ml Ketamin-Lösung (100 mg/ml) mit 8,125 ml 0,9 % NaCI-Lösung gemischt.

Es wurden gewichtsadapiert 0,1 ml/mg/KG der Lösung intraperitoneal injiziert.

Fixierungslösung/ Perfusionslösung : Glutaraldehydpuffer 2,5 %

50 ml 0,2 M Natriumdihydrogenphosphatlösung (NaH₂PO₄) wurden zusammen mit 10 ml 0,5 M Di-Natriumhydrogenphosphatlösung (Na₂HPO₄) und 30 ml Aqua dest. und 10 ml 25 % Glutaraldehyd gemischt.

Nachfixierungslösung:

Lösung A:

Zur Herstellung von 100 ml dieser Lösung (2 % Osmiumtetroxid) wurden 2 g Osmiumtetroxid in 100 ml Aqua dest. gelöst.

Lösung B:

Zur Herstellung von 100 ml dieser Lösung wurden 6,846 g Saccharose in 100 ml 0,2 M Phophatpuffer gelöst.

Die Lösung A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt.

Kunststoff (Epon):

Stammlösung A:

77 ml Glycidether wurden mit 125 ml DDSA gemischt.

Stammlösung B:

100 ml Glycidether wurden mit 89 ml MNA gemischt.

Die Stammlösungen A und B wurden im Verhältnis 4:6 mit 2 % Accelerator (2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol) schlierenfrei hergestellt.

Färbelösung:

Zur Herstellung der Lösung wurde 1 g Toluidinblau 1 % in 100 ml Borax-Lösung (1 g Natriumtetraborat in 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer) 1 % gelöst.

Kontrastierungslösungen:

1. Lösung:

Zur Herstellung wurden 0,5 g Uranylacetat in 50 ml Aqua dest. gelöst.

2. Lösung:

Zur Herstellung wurden zuerst 1,33 g Blei-II-Nitrat und 1,76 g Tri-Natriumcitrat Dihydrat in 30 ml Aqua dest. gelöst und dann mit Natronlauge 1 M klartitriert und auf 50 ml Aqua dest. aufgefüllt.

6 Methoden

6.1 <u>Eingesetzte Tiere</u>

Für meine Experimente verwendete ich zwei verschiedene Mäusezuchtstämme. Zum einen die Pah^{enu2}-Maus nach von Shedlosky et al. (1993) etablierten Modell, welche über eine Mutation im Gen der L-Phenylalaninhydroxylase (KO-Maus) verfügt, gezüchtet aus der Maus des Zuchtstammes C57/BI6 und zum anderen die Wildtypmaus des Zuchtstammes C57/BI6 (WT-Maus) als Kontrollgruppe meiner Untersuchungsergebnisse.

Die Bereitstellung der Tiere erfolgte durch den Tierstall des UKE. Es wurden jeweils 3-4 Mäuse beider Gruppen in den Altersstufen zwei Wochen, drei Wochen, vier Wochen, acht Wochen, zwölf Wochen und 35 Wochen untersucht, wobei das Geschlecht unbeachtet geblieben ist. Der Genotyp der KO-Mäuse wurde mittels Genotypisierung nach (McDonald & Charlton, 1997) ermittelt, da für die Experimente nur homozygote KO-Mäuse untersucht werden sollten.

Die Haltung der Mäuse erfolgte unter kontrollierten Bedingungen mit Tag und Nachtphasen von jeweils 12 Stunden. Den Mäusen standen Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung. Die Haltung der Tiere fand ohne eine bestimmte Diät statt. Alle meine Experimente erfolgten in Übereinstimmung mit den geltenden gesetzlichen Bestimmungen der Behörde für Gesundheit und Wissenschaft.

6.2 Perfusion und Entnahme der Hippocampi

Die Pah^{enu2}-Mäuse und Wildtyp-Mäuse der entsprechenden Altersstufen wurden zunächst durch eine intraperitoneale Injektion von 0,1 ml/mg/KG Ketamin/Xylazin-Lösung narkotisiert. Nach Eintritt der Narkose erfolgte eine Fixierung der Tiere auf dem Rücken liegend.

In tiefer Narkose liegend wurde den Mäusen mit einer Schere die Bauchdecke, der Thorax und das Peritoneum eröffnet und das Diaphragma durchtrennt und somit das Herz dargestellt. Das rechte Herzohr wurde als Ablauf eröffnet. Eine mit dem Perfusor verbundene Kanüle wurde an der Herzspitze in den linken Ventrikel eingeführt. Über den Perfusor wurde primär das Blut aus dem Kreislauf der Tiere mittels 30 ml eines 0,1 M Phosphatpuffer heraus gespült. Anschließend wurden die Tiere über den Perfusor circa 15 Minuten mit 2,5 % Glutaraldehydpuffer perfundiert, um eine erste Fixierung des Gewebes zu erhalten.

Nach der Perfusion erfolgte die Dekapitierung der Tiere und die Haut wurde über der Schädelkalotte resiziert. Mit einer kleinen Knochenzange wurde das Schädeldach median sagittal eröffnet. Das Gehirn der Tiere wurde mit Hilfe eines Heidemannspatels entnommen und in 2,5 % Glutaraldehydpuffer bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Nach ausreichender Fixierdauer fand nun eine Entnahme der Hippocampi statt. Dazu wurde zunächst das Kleinhirn mit einem Skalpell abgetrennt und beide Gehirnhälften durch einen medianen Schnitt voneinander getrennt, um nun das Mittel- und Zwischenhirn herauszulösen. Mit einem Heidemannspatel konnte nun der Hippocampus herauspräpariert werden. Nun wurde der linke und rechte Hippocampus jeweils median geteilt, sodass man die ventralen und dorsalen Abschnitte in getrennte Proben aufgeteilt hatte. Die Proben wurden nun wieder in die Fixierlösung dem 2,5 % Glutaraldeydpuffer gegeben, wobei die Hippocampi für eine Fixierdauer von mindestens 24 Stunden in der Fixierlösung bei 4 °C im Kühlschrank verbleiben mussten.

6.3 <u>Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie</u>

Beginnend wurde der 2,5 % Glutaraldehydpuffer, in welcher die präparierten Hippocampi aufbewahrt worden sind, verworfen. Zur Optimierung der Darstellbarkeit des Gewebes fand eine Nachfixierung der Präparate statt. Hierzu setzte man die Proben für die Dauer von einer Stunde der Nachfixierungslösung aus. Die Nachfixierungslösung bestand aus einer 2 % Osmiumtetroxidlösung im Verhältnis 1:1 in einem mit Saccharose versetzen 0,2 M Phosphatpuffer gemischt.

Es folgte eine Dehydrierung der Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe, um spätere Gewebedestruktionen zu minimieren. Die Dehydrierung wurde durch Ethanol verdünnt mit Aqua dest. in aufsteigender Konzentration (35 % / 50 % / 70 % / 96 %) für jeweils fünfzehn Minuten durchgeführt, terminiert mit zwei Durchgängen mit nahezu 100 %igem Ethanol. Dem schlossen sich zwei Durchgänge mit Propylenoxid an, welche auch jeweils 15 Minuten dauerten, um das Restwasser gesichert aus den Präparaten zu entfernen.

Für die darauffolgende Nacht erfolgte die Einbettung der Präparate bei Raumtemperatur in ein Kunststoff Intermediat. Die Kunststofflösung wurde aus den sogenannten Lösungen A (Glycidether / DDSA) und B (Glycidether / MNA) schlierenfrei angerührt und mit einem 2 %igem als Accelerator fungierendem Zusatz aus 2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol versetzt. Drei Teile dieser Lösung wurden dann mit einem Teil Propylenoxid zu einem Kunststoff Intermediat gemischt und auf die Präparate gegeben. Im Anschluss daran erfolgte die Entnahme der Präparate aus den Gefäßen und eine Einbettung mit der Kunststofflösung in Tiefziehfolien, wobei auf die richtige Positionierung der Präparate geachtet werden musste. So vorbereitet lagerten sie zur Aushärtung für eine Nacht in einen Brutschrank bei einer Temperatur von 68 °C.

Am darauffolgenden Tag wurden die Proben aus der Folie ausgeschnitten und auf beschriftete Aluminiumblöcke geklebt. Diese wurden dann für drei Stunden in den Brutschrank bei einer Temperatur von 68 °C gegeben.

Nachdem der überflüssige Kunststoff mit Hilfe eines Tellerschleifgerätes und einer Klinge entfernt worden ist, wurden die Proben unter Zuhilfenahme eines Glasschneidemesser mit einer Schnittdicke von 10 µm soweit angeschnitten, bis der Hippocampus vollständig erkennbar war.

Die Semidünnschnitte für die Lichtmikroskopie erfolgten mit Hilfe des Microtom Supercut mittels Diamantmessers mit einer Schnittdicke von 1 µm und es fand anschließend frei schwimmend bei einer Temperatur von 80 °C in Toluidinblau eine Färbung statt. In der darauffolgenden Mikroskopie der Semidünnschnitte wurden die CA1 Regionen in den ventralen Hippocampi und die CA3 Regionen in den dorsalen Hippocampi dargestellt, um sie dann anschließend unter der Stereolupe gezielt mittels einer Klinke zurecht zu schneiden.

Die Ultradünnschnitte wurden am Ultramicrotom Ultracut mit einer Schnittdicke von 0,1 µm hergestellt. Jeweils zwei Folgeschnitte wurden mittels Platindrahtöse auf einen 3 mm Durchmesser großen Kupferschlitzträger aufgezogen.

Anschließend erfolgte die Kontrastierung nach der Methode von Reynolds (Reynolds, 1963). Zunächst wurde den Schnitten für 30 min Uranylacetat und im Anschluss an einen Waschgang für fünf Minuten Bleicitrat zugesetzt. Abschließend beendete ein weiterer Spülgang die Kontrastierung.

45

Im Elektronenmikroskop wurden die Schnitte bei einer 6600-fachen Vergrößerung mikroskopiert. Pro Kupferschlitzträger wurden von den jeweiligen Folgeschnitten jeweils zehn verschiedene Felder ausgewählt und fotografiert, dabei erhielt man insgesamt zwanzig Aufnahmen mit zehn zu vergleichenden Bildpaaren.

Für die Entwickelung der Fotos wurden zuerst die Negative entwickelt, fixiert und getrocknet und anschließend mit einem Vergrößerungsbelichtungsgerät das Fotopapier im DIN A4-Format belichtet, entwickelt, fixiert, gewässert und getrocknet.

6.4 <u>Stereologische Auszählung der Spinesynapsen in den Hippocampusregionen</u> <u>CA1 und CA3</u>

Die Bilder wurden, um eine möglichst große Objektivität zu erreichen, nach einem Standardschema gezählt. Es wurde definiert, dass nur Spinesynapsen als solche gezählt werden, wenn sie über die in Abb.8 markierten Strukturen verfügen.



Abbildung 8: Elektronenmikroskopisches Bild einer Gray I-Synapse. Ausschnitt aus einer 35 Wochen KO Aufnahme. Gekennzeichnet sind beispielshaft präsynaptische Vesikel, die präsynaptische Membran, der synaptische Spalt und die postsynaptische Dichte. Der Maßstab ist in der linken unteren Ecke angegeben.

Somit fand, wegen der Ausprägung der postsynaptischen Dichte, lediglich eine Zählung der asymmetrischen exzitatorischen Gray I Synapsen statt.

Es fand kontinuierlich ein Vergleich der bei der Elektronenmikroskopie erstellten Bildpaare statt. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe von Klarsichtfolie. Zunächst wurden auf dem ersten Bild alle Spinesynapsen, die über die oben genannten Strukturen verfügten, farbig markiert. Im Anschluss daran wurde die Klarsichtfolie dann auf das zweite Bild übertragen, um dort alle Spinesynapsen zu markieren, welche im ersten Bild nicht zu finden waren. Durch dieses Verfahren konnte ein dreidimensionaler Raum ausgewertet werden.

Nun wurde ein 20 x 20 cm großes weißes Papier in die rechte obere Ecke unter die Klarsichtfolie gelegt und alle dort befindlichen farbigen Markierungen gezählt. Anhand des abgebildeten Maßstabes und der bekannten Schnittdicke von 0,1 μ m konnte die 20 x 20 cm große Zählfläche auf das tatsächliche Volumen im Hippocampus von 10 μ m³ zurück gerechnet werden. Qualitativ minderwertige Aufnahmen wurden der Auswertung entzogen.

6.5 <u>Auswertung durch Vergleich der Spinesynapsenzahlen der Pah^{enu2}-Mäuse und</u> Wildtypkontrollen der jeweiligen Altersstufe

Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel 2007. Dort wurden tabellarisch die Mittelwerte der Spinesynapsenzahlen der KO- und WT-Mäuse in der CA1 bzw. CA3 Region der jeweiligen Jahrgänge miteinander verglichen. Im Weiteren wurde sowohl die Standardabweichung als auch der Standardfehler berechnet und hieran anschließend der zweiseitige T-Test zur Signifikanzprüfung durchgeführt.

7 Ergebnisse

Die Ergebnisse der einzelnen Altersstufen werden zur besseren Übersicht chronologisch dargestellt. Es werden zuerst die Ergebnisse der CA1 Region und anschließend die Ergebnisse der CA3 Region vorgestellt. Abschließend folgt eine zusammenfassende Darstellung der Entwicklung der Spinesynapsen über den gesamten untersuchten Zeitraum.

Es fand ein kontinuierlicher Vergleich der Mittelwerte der Spinesynapsen der KO-Mäuse mit denen der WT-Mäuse-Kontrollgruppe in einem Volumen im Präparat von 10 µm³ statt.

Hierzu wurde für die CA1 Region immer jeweils der ventrale Anteil des linken und rechten Hippocampi und für die CA3 Region immer jeweils der dorsale Anteil des linken und rechten Hippocampi in den Mäusegehirnen untersucht. Jedoch konnten bei einigen Präparaten, die zu untersuchende Region nicht dargestellt werden, besonders häufig traf dies bei der CA3 Region zu, sodass die Anzahl der untersuchten Tiere nicht direkt auf die Anzahl der untersuchten Hippocampi schließen lässt.

In den einzelnen Altersstufen der beiden untersuchten Regionen wird die Anzahl der untersuchten Mäuse jeweils mit "N" angegeben und die Anzahl der untersuchten Hippocampi jeweils mit "n".

Die Spinesynapsen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, gezählt und ausgewertet. Dabei wurden aus den Präparaten Ultradünnschnitten hergestellt und aus diesen im Elektronenmikroskop immer jeweils zehn Bildpaare erstellt.

Zunächst erfolgte eine Untersuchung der adulten Mäuse im Alter von zwölf Wochen. Daraufhin wurden Mäuse im Alter von acht Wochen erforscht. Danach fand eine chronologische Untersuchung für die Altersstufen der zwei, drei und vier Wochen und abschließend der 35 Wochen alten Mäuse statt.

Folgend werden beispielshaft jeweils aus der CA1 bzw. CA3 Region jeweils ein Ausschnitt aus den EM-Bildern der KO- bzw. WT-Maus gezeigt. Dafür diente als Grundlage die Altersstufe der 35 Wochen alten Mäuse.

Beispielhafte Darstellung der CA1 Region der 35 Wochen alten Mäuse:



Abbildung 9: Ausschnitt aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der 35 Wochen alten Mäuse der CA1 Region. Links: KO-Maus. Rechts: WT-Maus. Mit schwarzen Pfeilen sind jeweils die Synapsen markiert. Der Maßstab ist in der linken unteren Ecke angegeben.

Beispielhafte Darstellung der CA3 Region der 35 Wochen alten Mäuse:



Abbildung 10: Ausschnitt aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der 35 Wochen alten Mäuse der CA3 Region. Links: KO-Maus. Rechts: WT-Maus. Mit schwarzen Pfeilen sind jeweils die Synapsen markiert. Der Maßstab ist in der linken unteren Ecke angegeben.

7.1 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwei Wochen alten Mäuse

Die Untersuchung der zwei Wochen alten Mäuse wurde jeweils an drei KO-Mäusen und drei WT-Mäusen (N = 3) durchgeführt.

Dazu wurden die Mäuse im Alter von genau zwei Wochen durch Perfusion getötet, anschließend die Gehirne bzw. Hippocampi entnommen, für die Elektronenmikroskopie aufbereitet, im Elektronenmikroskop mikroskopiert und abschließend die Bilder ausgewertet. Bei allen weiteren Altersstufen wurde äquivalent vorgegangen.

Es erfolgte eine Untersuchung von fünf CA1 Regionen bzw. Präparaten der KO-Mäuse und sechs der WT-Mäuse (KO: n = 5; WT: n = 6).

Die CA1 Region wies in dieser Altersstufe keinen signifikanten Unterschied (p = 0,99) in der Spinesynapsendichte vor, wobei der relative Unterschied, wenn man die Kontrollgruppe auf 100 % setzt, bei -1,94 % lag.

Es wurde für die KO-Mäuse ein Mittelwert von 21,24 Spinesynapsen pro 10 μ m³ und für die Kontrollgruppe der WT-Mäuse 21,66 Spinesynapsen pro 10 μ m³ mit einem errechneten Standardfehler von jeweils 1,48 bei den KO-Mäusen und 2,6 bei den WT-Mäusen ermittelt.

Vergleich der Spinesynapsen der Generation 2 Wochen in der CA1 Region					
Spinesynapsen Standardfehler Prozentualer p n pro 10 µm ³ Unterschied					n
KO	21,24	1,48	-1 01 %	0.00	5
WT	21,66	2,6	-1,94 %	0,99	6

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse der CA1 Region der 2 Wochen. n = Anzahl der untersuchten Hippocampi. Die Kontrollgruppe entspricht 100 %.

Die Untersuchung der CA3 Region erfolgte anhand von vier Präparaten der KO-Mäuse und sechs der WT-Mäuse (KO: n = 4; WT: n = 6).

Die CA3 Region wies wie auch die CA1 Region in dieser Altersstufe keinen signifikanten Unterschied (p = 0,51) in der Spinesynapsendichte auf, wobei der

relative Unterschied, wenn man die Kontrollgruppe wieder auf 100 % setzt, bei -6,36 % lag.

Es ergab sich bei den KO-Mäusen ein Mittelwert von 19 Spinesynapsen pro 10 μ m³ mit einem Standardfehler von 0,29 und bei den WT-Mäusen ein Mittelwert von 20,29 Spinesynapsen pro 10 μ m³ mit einem Standardfehler von 1,5.

Vergleich der Spinesynapsen der Generation 2 Wochen in der CA3 Region					
	Spinesynapsen	Standardfehler	Prozentualer	р	n
	pro 10 µm³		Unterschied		
КО	19	0,29	-6.36 %	0.51	4
WT	20,29	1,5	-0,30 %	0,51	6

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse der CA3 Region der 2 Wochen. n = Anzahl der untersuchten Hippocampi. Die Kontrollgruppe entspricht 100 %.

Die Ergebnisse der beiden untersuchten Regionen erreichten mit p = 0,99 (CA1) und p = 0,51 (CA3) nicht das 5 %-Signifikanzniveau.



Abbildung 11: Säulendiagramm der Spinesynapsen der Generation 2 Wochen in der Region CA1 (links) und CA3 (rechts) des Hippocampus. Dargestellt sind in dunkelgrau jeweils die Ergebnisse der KO-Mäuse und in hellgrau jeweils die Ergebnisse der WT-Mäuse. Dabei werden die Mittelwerte der Spinesynapsen, die Standardfehler, die p-Werte und mit n = die Anzahl der untersuchten Hippocampi angegeben.

7.2 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der drei Wochen alten Mäuse

Die Untersuchung der drei Wochen alten Mäuse wurde jeweils an drei KO-Mäusen und WT-Mäusen (N = 3) durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse im Alter von genau drei Wochen durch Perfusion getötet.

Geprüft wurden jeweils sechs CA1 Regionen bzw. Präparate der KO-Mäuse und sechs der WT-Mäuse (KO: n = 6; WT: n = 6).

Die CA1 Region zeigte auch in dieser Altersstufe keinen signifikanten Unterschied (p = 0,67) in der Spinesynapsendichte, wobei der relative Unterschied, wenn man die Kontrollgruppe auf 100 % setzt, bei -3,33 % lag.

Es wurde für die KO-Mäuse ein Mittelwert von 39,13 Spinesynapsen pro 10 μ m³ und für die Kontrollgruppe der WT-Mäuse 40,48 Spinesynapsen pro 10 μ m³ mit einem errechneten Standardfehler von jeweils 2,04 bei den KO-Mäusen und 2,31 bei den WT-Mäusen ermittelt.

Vergleich der Spinesynapsen der Generation 3 Wochen in der CA1 Region					
Spinesynapsen Standardfehler Prozentualer p n pro 10 µm ³ Unterschied					
KO	39,13	2,04	2 22 0/	0.67	6
WT	40,48	2,31	-3,33 %	0,07	6

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse der CA1 Region der 3 Wochen.n = Anzahl der untersuchten Hippocampi. Die Kontrollgruppe entspricht 100 %.

Die CA3 Region wurde anhand von vier Präparaten der KO-Mäuse und sechs der WT-Mäuse untersucht (KO: n = 4; WT: n = 6).

Die CA3 Region wies wie auch die CA1 Region ebenfalls in dieser Altersstufe keinen signifikanten Unterschied (p = 0,58) in der Spinesynapsendichte auf, wobei der relative Unterschied, wenn man die Kontrollgruppe wieder auf 100 % setzt, bei - 5,54 % lag.

Es ergab sich bei den KO-Mäusen ein Mittelwert von 25,6 Spinesynapsen pro 10 µm³ mit einem Standardfehler von 1,68 und bei den WT-Mäusen ein Mittelwert von 27,1 Spinesynapsen pro 10 µm³ mit einem Standardfehler von 1,92.

Vergleich der Spinesynapsen der Generation 3 Wochen in der CA3 Region						
	Spinesynapsen Standardfehler Prozentualer p n pro 10 μm ³ Unterschied					
KO	25,6	1,68	- 5 51 %	0.58	4	
WT	27,1	1,92	- 3,34 %	0,00	6	

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse der CA3 Region der 3 Wochen. n = Anzahl der untersuchten Hippocampi. Die Kontrollgruppe entspricht 100 %.

Die Ergebnisse der beiden untersuchten Regionen erreichten mit p = 0,67 (CA1) und p = 0,58 (CA3) erneut nicht das 5 %-Signifikanzniveau.



Abbildung 12: Säulendiagramm der Spinesynapsen der Generation 3 Wochen in der Region CA1 (links) und CA3 (rechts) des Hippocampus. Dargestellt sind in dunkelgrau jeweils die Ergebnisse der KO-Mäuse und in hellgrau jeweils die Ergebnisse der WT-Mäuse. Dabei werden die Mittelwerte der Spinesynapsen, die Standardfehler, die p-Werte und mit n = die Anzahl der untersuchten Hippocampi angegeben.

7.3 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der vier Wochen alten Mäuse

Die Untersuchung der vier Wochen alten Mäuse wurde auch wieder jeweils an drei KO-Mäusen und drei WT-Mäusen (N = 3) durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse im Alter von genau vier Wochen durch Perfusion getötet.

Untersucht wurden jeweils sechs CA1 Regionen bzw. Präparate der KO-Mäuse und sechs der WT-Mäuse (KO: n = 6; WT: n = 6).

Die CA1 Region wies in dieser Altersstufe einen signifikanten Unterschied (p = 0,0036) in der Spinesynapsendichte auf. Die KO-Mäuse zeigten in den untersuchten Präparaten signifikant mehr Spinesynapsen, mit einem relativen Unterschied, ermittelt wie oben beschrieben, von +21,43 %.

Es wurde für die KO-Mäuse ein Mittelwert von 40,8 Spinesynapsen pro 10 μ m³ und für die Kontrollgruppe der WT-Mäuse 33,6 Spinesynapsen pro 10 μ m³ mit einem errechneten Standardfehler von jeweils 1,31 bei den KO-Mäusen und 1,38 bei den WT-Mäusen ermittelt.

Vergleich der Spinesynapsen der Generation 4 Wochen in der CA1 Region						
Spinesynapsen Standardfehler Prozentualer p n Pro 10 um ³						
КО	40,8	1,31	121 42 %	0.0026	6	
WT	33,6	1,38	+21,43 %	0,0030	6	

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse der CA1 Region der 4 Wochen.n = Anzahl der untersuchten Hippocampi. Die Kontrollgruppe entspricht 100 %.

Die Untersuchung der CA3 Region erfolgte anhand von fünf Präparaten der KO-Mäuse und sechs der WT-Mäuse (KO: n = 5; WT: n = 6).

Die CA3 Region zeigte wie auch die CA1 Region in dieser Altersstufe einen signifikanten Unterschied (p = 0,026) in der Spinesynapsendichte. Die KO-Mäuse wiesen in den untersuchten Präparaten signifikant mehr Spinesynapsen auf, mit einem relativen Unterschied, ermittelt wie oben beschrieben, von +28,97 %.

Es ergab sich bei den KO-Mäusen ein Mittelwert von 27,6 Spinesynapsen pro 10 µm³ mit einem Standardfehler von 2,13 und bei den WT-Mäusen ein Mittelwert von 21,4 Spinesynapsen pro 10 µm³ mit einem Standardfehler von 1,98.

Vergleich der Spinesynapsen der Generation 4 Wochen in der CA3 Region					
Spinesynapsen Standardfehler Prozentualer p n Pro 10 μm ³ Unterschied					
KO	27,6	2,13	1 28 07 %	0.026	5
WT	21,4	1,98	+20,97 %	0,020	6

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse der CA3 Region der 4 Wochen. n = Anzahl der untersuchten Hippocampi. Die Kontrollgruppe entspricht 100 %.

Die Ergebnisse der beiden untersuchten Regionen erreichten für die CA1 Region mit p = 0,0036 und für die CA3 Region mit p = 0,026 das 5 %-Signifikanzniveau.



Abbildung 13: Säulendiagramm der Spinesynapsen der Generation 4 Wochen in der Region CA1 (links) und CA3 (rechts) des Hippocampus. Dargestellt sind in dunkelgrau jeweils die Ergebnisse der KO-Mäuse und in hellgrau jeweils die Ergebnisse der WT-Mäuse. Dabei werden die Mittelwerte der Spinesynapsen, die Standardfehler, die p-Werte und mit n = die Anzahl der untersuchten Hippocampi angegeben.

7.4 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der acht Wochen alten Mäuse

Die Untersuchung der acht Wochen alten Mäuse wurde jeweils an vier KO-Mäusen und vier WT-Mäusen (N = 4) durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse im Alter von genau acht Wochen durch Perfusion getötet.

Es erfolgte eine Untersuchung von sieben CA1 Regionen bzw. Präparaten der KO-Mäuse und sechs der WT-Mäuse (KO: n = 7; WT: n = 6).

Die CA1 Region wies auch in dieser Altersstufe einen signifikanten Unterschied (p = 0,0022) in der Spinesynapsendichte auf. Die KO-Mäuse zeigten in den untersuchten Präparaten signifikant mehr Spinesynapsen, mit einem relativen Unterschied, ermittelt wie oben beschrieben, von +22,79 %.

Es wurde für die KO-Mäuse ein Mittelwert von 29,96 Spinesynapsen pro 10 μ m³ und für die Kontrollgruppe der WT-Mäuse 24,4 Spinesynapsen pro 10 μ m³ mit einem errechneten Standardfehler von jeweils 0,95 bei den KO-Mäusen und 1,03 bei den WT-Mäusen ermittelt.

Vergleich der Spinesynapsen der Generation 8 Wochen in der CA1 Region						
	Spinesynapsen Standardfehler Prozentualer p n pro 10 μm ³ Unterschied					
KO	29,96	0,95	122 70 %	0 0000	7	
WT	24,4	1,03	+22,19 %	0,0022	6	

Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse der CA1 Region der 8 Wochen. n = Anzahl der untersuchten Hippocampi. Die Kontrollgruppe entspricht 100 %.

Die CA3 Region wurde anhand von sechs Präparaten der KO-Mäuse und sieben der WT-Mäuse untersucht (KO: n = 6; WT: n = 7).

Die CA3 Region wies wie auch die CA1 Region in dieser Altersstufe abermals einen signifikanten Unterschied (p = 0,017) in der Spinesynapsendichte auf. Die KO-Mäuse zeigten in den untersuchten Präparaten signifikant mehr Spinesynapsen, mit einem relativen Unterschied, ermittelt wie oben beschrieben, von +11,25 %.

Es ergab sich bei den KO-Mäusen ein Mittelwert von 25,21 Spinesynapsen pro 10 μ m³ mit einem Standardfehler von 2,88 und bei den WT-Mäusen ein Mittelwert von 22,66 Spinesynapsen pro 10 μ m³ mit einem Standardfehler von 2,03.

Vergleich der Spinesynapsen der Generation 8 Wochen in der CA3 Region					
	Spinesynapsen	Standardfehler	Prozentualer	р	n
	pro 10 µm³		Unterschied		
KO	25,21	2,88	11 25 %	0.017	6
WT	22,66	2,03	+11,25 %	0,017	7

Tabelle 8: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse der CA3 Region der 8 Wochen.n = Anzahl der untersuchten Hippocampi. Die Kontrollgruppe entspricht 100 %.

Die Ergebnisse der beiden untersuchten Regionen erreichten für die CA1 Region mit p = 0,0022 und für die CA3 Region mit p = 0,017 das 5 %-Signifikanzniveau.



8 Wochen

Abbildung 14: Säulendiagramm der Spinesynapsen der Generation 8 Wochen in der Region CA1 (links) und CA3 (rechts) des Hippocampus. Dargestellt sind in dunkelgrau jeweils die Ergebnisse der KO-Mäuse und in hellgrau jeweils die Ergebnisse der WT-Mäuse. Dabei werden die Mittelwerte der Spinesynapsen, die Standardfehler, die p-Werte und mit n = die Anzahl der untersuchten Hippocampi angegeben.

7.5 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der zwölf Wochen alten Mäuse

Die Untersuchung der zwölf Wochen alten Mäuse wurde jeweils an vier KO-Mäusen und vier WT-Mäusen (N = 4) durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse im Alter von genau zwölf Wochen durch Perfusion getötet.

Untersucht wurden acht CA1 Regionen bzw. Präparate der KO-Mäuse und fünf der WT-Mäuse (KO: n = 8; WT: n = 5).

Die CA1 Region wies auch in dieser Altersstufe wiederum einen signifikanten Unterschied (p = 0,00032) in der Spinesynapsendichte auf. Die KO-Mäuse zeigten in den untersuchten Präparaten erneut signifikant mehr Spinesynapsen, mit einem relativen Unterschied, ermittelt wie oben beschrieben, von +62,24 %.

Es wurde für die KO-Mäuse ein Mittelwert von 32,87 Spinesynapsen pro 10 μ m³ und für die Kontrollgruppe der WT-Mäuse 20,26 Spinesynapsen pro 10 μ m³ mit einem errechneten Standardfehler von jeweils 1,85 bei den KO-Mäusen und 0,74 bei den WT-Mäusen ermittelt.

Vergleich der Spinesynapsen der Generation 12 Wochen in der CA1 Region					
Spinesynapsen Standardfehler Prozentualer p					n
	pro 10 µm³		Unterschied		
KO	32,87	1,85	162 24 %	0 00022	8
WT	20,26	0,74	+02,24 70	0,00032	5

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse der CA1 Region der 12 Wochen. n = Anzahl der untersuchten Hippocampi. Die Kontrollgruppe entspricht 100 %.

Die CA3 Region wurde anhand von acht Präparaten der KO-Mäuse und fünf der WT-Mäuse untersucht (KO: n = 8; WT: n = 5).

Die CA3 Region wies wie auch die CA1 Region in dieser Altersstufe wieder einen signifikanten Unterschied (p = 0,018) in der Spinesynapsendichte auf. Die KO-Mäuse zeigten in den untersuchten Präparaten signifikant mehr Spinesynapsen, mit einem relativen Unterschied, ermittelt wie oben beschrieben, von +59,25 %.

Es ergab sich bei den KO-Mäusen ein Mittelwert von 20,91 Spinesynapsen pro 10 μ m³ mit einem Standardfehler von 1,38 und bei den WT-Mäusen ein Mittelwert von 13,13 Spinesynapsen pro 10 μ m³ mit einem Standardfehler von 2,8.

Vergleich der Spinesynapsen der Generation 12 Wochen in der CA3 Region					
	Spinesynapsen	Standardfehler	Prozentualer	р	n
	pro 10 µm³		Unterschied		
KO	20,91	1,38		0.019	8
WT	13,13	2,8	+59,25 %	0,010	5

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse der CA3 Region der 12 Wochen.n = Anzahl der untersuchten Hippocampi. Die Kontrollgruppe entspricht 100 %.

Die Ergebnisse der beiden untersuchten Regionen erreichten für die CA1 Region mit p = 0,00032 und für die CA3 Region mit p = 0,018 das 5 %-Signifikanzniveau.



Abbildung 15: Säulendiagramm der Spinesynapsen der Generation 12 Wochen in der Region CA1 (links) und CA3 (rechts) des Hippocampus. Dargestellt sind in dunkelgrau jeweils die Ergebnisse der KO-Mäuse und in hellgrau jeweils die Ergebnisse der WT-Mäuse. Dabei werden die Mittelwerte der Spinesynapsen, die Standardfehler, die p-Werte und mit n = die Anzahl der untersuchten Hippocampi angegeben.

7.6 Quantitative Bestimmung der Spinesynapsen der 35 Wochen alten Mäuse

Die Untersuchung der 35 Wochen alten Mäuse wurde jeweils an drei KO-Mäusen und drei WT-Mäusen (N = 3) durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse im Alter von genau 35 Wochen durch Perfusion getötet.

Es erfolgte jeweils eine Untersuchung von fünf CA1 Regionen bzw. Präparaten der KO-Mäuse und WT-Mäuse (KO: n = 5; WT: n = 5).

Die CA1 Region wies in dieser Altersstufe keinen signifikanten Unterschied (p = 0,31) in der Spinesynapsendichte auf, mit einem relativen Unterschied, ermittelt wie oben beschrieben, von +6,45 %.

Es wurde für die KO-Mäuse ein Mittelwert von 42,92 Spinesynapsen pro 10 μ m³ und für die Kontrollgruppe der WT-Mäuse 40,32 Spinesynapsen pro 10 μ m³ mit einem errechneten Standardfehler von jeweils 2,09 bei den KO-Mäusen und 1,16 bei den WT-Mäusen ermittelt.

Vergleich der Spinesynapsen der Generation 35 Wochen in der CA1 Region					
	Spinesynapsen pro 10 µm³	Standardfehler	Prozentualer Unterschied	p	n
KO	42,92	2,09	16 15 %	0.21	5
WT	40,32	1,16	+0,40 %	0,37	5

Tabelle 11: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse der CA1 Region der 35 Wochen.n = Anzahl der untersuchten Hippocampi. Die Kontrollgruppe entspricht 100 %.

Die CA3 Region wurde anhand von vier Präparaten der KO-Mäuse und fünf der WT-Mäuse untersucht (KO: n = 4; WT: n = 5).

Die CA3 Region zeigte wie auch die CA1 Region in dieser Altersstufe keinen signifikanten Unterschied (p = 0.58) in der Spinesynapsendichte, mit einem relativen Unterschied, ermittelt wie oben beschrieben, von -5,73 %.

Es ergab sich bei den KO-Mäusen ein Mittelwert von 29,43 Spinesynapsen pro 10 μ m³ mit einem Standardfehler von 1,02 und bei den WT-Mäusen ein Mittelwert von 31,22 Spinesynapsen pro 10 μ m³ mit einem Standardfehler von 2,58.

Vergleich der Spinesynapsen der Generation 35 Wochen in der CA3 Region					
	Spinesynapsen pro 10 µm³	Standardfehler	Prozentualer Unterschied	p	n
KO	29,43	1,02	- 5,73 % 0,	0.58	4
WT	31,22	2,58		0,00	5

Tabelle 12: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse der CA3 Region der 35 Wochen.n = Anzahl der untersuchten Hippocampi. Die Kontrollgruppe entspricht 100 %.

Die Ergebnisse der beiden untersuchten Regionen erreichten mit p = 0,31 (CA1) und p = 0,58 (CA3) nicht das 5 %-Signifikanzniveau.



Abbildung 16: Säulendiagramm der Spinesynapsen der Generation 35 Wochen in der Region CA1 (links) und CA3 (rechts) des Hippocampus. Dargestellt sind in dunkelgrau jeweils die Ergebnisse der KO-Mäuse und in hellgrau jeweils die Ergebnisse der WT-Mäuse. Dabei werden die Mittelwerte der Spinesynapsen, die Standardfehler, die p-Werte und mit n = die Anzahl der untersuchten Hippocampi angegeben.

7.7 Verlauf der Spinesynapsenentwicklung in der CA1 Region

Zunächst erfolgt die Darstellung des Verlaufes der Spinesynapsenentwicklung der WT-Kontrollgruppe über den gesamten untersuchten Zeitraum. Die Spinesynapsendichte steigt von der zweiten Lebenswoche zur dritten Lebenswoche physiologisch an, hier bei den WT-Mäusen um +46 %. Nach der dritten Lebenswoche beginnt die physiologische Reduktion der Spinesynapsen (Pruning), hier bei den WT-Mäusen insgesamt um -50 %. In der 35. Lebenswoche steigt die Spinesynapsendichte bei den WT-Mäusen um +50 % an.



Abbildung 17: Säulendiagramm des Verlaufes der Spinesynapsenentwicklung der WT-Kontrollgruppe über den gesamten untersuchten Zeitraum in der CA1 Region des Hippocampus. Dargestellt sind die Mittelwerte der Spinesynapsen, die Standardfehler und mit n = die Anzahl der untersuchten Hippocampi.

Im Vergleich dazu zeigen die KO-Mäuse von der zweiten zur dritten Lebenswoche auch den physiologischen Anstieg der Spinesynapsendichte, wie auch die WT-Mäuse um +46 %. Jedoch steigen die Spinesynapsen nach der dritten Lebenswoche noch weiter bis zur vierten Lebenswoche, sodass die Spinesynapsen insgesamt um 48 % ansteigen. Die physiologische Reduktion beginnt erst nach der vierten Lebenswoche und verläuft im Vergleich zu der WT-Kontrollgruppe mit einer Abnahme von -16 % bzw. -20 % schwächer ab. In der 35. Lebenswoche ist die Spinesynapsendichte wieder auf dem gleichen Niveau der WT-Kontrollgruppe und verzeichnet einen Anstieg von +23 %.

	Vergleich der Spinesynapsenentwicklung in der CA1 Region				
	Prozentualer Verlauf des Spinesynapsenanstieges	Prozentualer Verlauf der Spinesynapsen Reduktion			
WT	 +46 % (2. Lebenswoche zur 3. Lebenswoche) +50 % (12. Lebenswoche zur 35. Lebenswoche) 	-50 % (3. Lebenswoche zur 12. Lebenswoche)			
КО	 +46 % (2. Lebenswoche zur 3. Lebenswoche) +48 % (2. Lebenswoche zur 4. Lebenswoche) +23 % (12. Lebenswoche zur 35. Lebenswoche) 	-16 % (3. Lebenswoche zur 12. Lebenswoche) -20 % (4. Lebenswoche zur 12. Lebenswoche)			

 Tabelle 13: Tabellarische Darstellung des prozentualen Verlaufes der Spinesynapsenentwicklung in der CA1 Region. Angegeben ist jeweils ausgehend von den jeweiligen Mittelwerten das Intervall des jeweiligen Spinesynapsenanstieges und der Spinesynapsen Reduktion in Prozent.



Abbildung 18: Säulendiagramm des Verlaufes der Spinesynapsenentwicklung der KO-Mäuse und der WT-Mäuse über den gesamten untersuchten Zeitraum in der CA1 Region des Hippocampus. Dargestellt sind in dunkelgrau jeweils die Ergebnisse der KO-Mäuse und in hellgrau jeweils die Ergebnisse der WT-Mäuse. Dabei werden die Mittelwerte der Spinesynapsen, die Standardfehler, die p-Werte und mit n = die Anzahl der untersuchten Hippocampi angegeben.

7.8 Verlauf der Spinesynapsenentwicklung in der CA3 Region

Der Verlauf der Spinesynapsenentwicklung in der CA3 Region zeigt ebenfalls zuerst den physiologischen Anstieg der Spinesynapsendichte. Bei den WT-Mäusen beträgt dieser +25 % und bei den KO-Mäusen +26 % bzw. +31 %. Dann zeigt sich auch hier die physiologische Reduktion dieser. Diese beträgt bei den WT-Mäusen -52 % und bei den KO-Mäusen -18 % bzw. -24 %. Daneben zeigt sich auch hier, dass die Reduktion der Spinesynapsen bei den KO-Mäusen erst später nach der vierten Lebenswoche einsetzt und auch dann wieder schwächer verläuft. In der 35. Lebenswoche sieht man hier ebenfalls einen Anstieg der Spinesynapsen, welcher insgesamt bei den KO-Mäusen und der WT-Kontrollgruppe auf einem vergleichbaren Niveau ist. Dieser Anstieg beträgt bei den WT-Mäusen +58 % und bei den KO-Mäusen +29 %.

Vergleich der Spinesynapsenentwicklung in der CA3 Region				
	Prozentualer Verlauf des Spinesynapsenanstieges	Prozentualer Verlauf der Spinesynapsen Reduktion		
WT	+25 % (2. Lebenswoche zur 3. Lebenswoche) +58 % (12. Lebenswoche zur 35. Lebenswoche)	-52 % (3. Lebenswoche zur 12. Lebenswoche)		
КО	 +26 % (2. Lebenswoche zur 3. Lebenswoche) +31 % (2. Lebenswoche zur 4. Lebenswoche) +29 % (12. Lebenswoche zur 35. Lebenswoche) 	-18 % (3. Lebenswoche zur 12. Lebenswoche) -24 % (4. Lebenswoche zur 12. Lebenswoche)		

Tabelle 14: Tabellarische Darstellung des prozentualen Verlaufes der Spinesynapsenentwicklungin der CA3 Region. Angegeben ist jeweils ausgehend von den jeweiligen Mittelwerten das Intervalldes jeweiligen Spinesynapsenanstieges und der Spinesynapsen Reduktion in Prozent.



Abbildung 19: Säulendiagramm des Verlaufes der Spinesynapsenentwicklung der KO-Mäuse und der WT-Mäuse über den gesamten untersuchten Zeitraum in der CA3 Region des Hippocampus. Dargestellt sind in dunkelgrau jeweils die Ergebnisse der KO-Mäuse und in hellgrau jeweils die Ergebnisse der WT-Mäuse. Dabei werden die Mittelwerte der Spinesynapsen, die Standardfehler, die p-Werte und mit n = die Anzahl der untersuchten Hippocampi angegeben.

8 Diskussion

In den vorgestellten Experimenten wurde die Frage untersucht, welchen Einfluss die pathologische Erhöhung der Serum- und Liquorspiegel der Aminosäure Phenylalanin auf die Zahl der Spinesynapsen im Stratum radiatum des Cornu ammonis der CA1 und CA3 Region des Hippocampus hat. Diese Untersuchungen wurden an der von Shedlosky et al., (1993) etablierten Pah^{enu2}-Maus in den Altersstufen zwei Wochen, drei Wochen, vier Wochen, acht Wochen, zwölf Wochen und 35 Wochen durchgeführt. Es erfolgte ein Vergleich der jeweiligen Ergebnisse mit der äquivalenten Altersstufe der WT-Maus des Stammes C57/Bl6. Als wesentliche Ergebnisse wurden, wie nachfolgend ausgeführt, gefunden:

- In der zweiten und dritten Lebenswoche war sowohl in der CA1 Region als auch der CA3 Region kein signifikanter Unterschied in der Spinesynapsendichte feststellbar.
- Ab der vierten bis zur zwölften Lebenswoche zeigen die KO-Mäuse eine signifikant höhere Spinesynapsendichte im Vergleich zur Kontrollgruppe, was bei den KO-Mäusen auf eine Störung des Prunings, der physiologischen Reduktion der Synapsen, hindeuten könnte.
- Die KO-Mäuse im Alter von 35 Wochen zeigen wieder eine Spinesynapsendichte auf dem gleichen Niveau der WT-Kontrollmäuse.
- Die Spinesynapsendichte steigt sowohl bei den WT-Mäusen als auch bei den KO-Mäusen im Alter von 35 Wochen wieder an.

8.1 Spreading und Pruning während der Synaptogenese

Pruning beschreibt, dass während der normalen Entwicklung anfangs dendritische Spines überproduziert und anschließend reduziert werden (Ramón y Cajal, 1904; Yuste & Bonhoeffer, 2001). Die Synaptogenese und das anschließende Pruning ist kein Mäuse spezifisches Phänomen, sondern konnte auch beim Menschen und anderen Spezien wie z.B. Ratten und auch Vögeln gezeigt werden (Crain et al., 1973; Huttenlocher, 1984; Segal et al., 2000; Paolicelli et al., 2011).

Die postnatale kortikale Entwicklung beim Menschen kann in zwei Phasen gegliedert werden. Die erste Phase beginnt mit der Geburt und endet mit Beendigung des ersten Lebensjahres. Sie zeichnet sich in einem Abfall der Neuronendichte, einem Anstieg der Synapsendichte und der Anzahl von Synapsen pro Neuron aus. Des Weiteren lässt sich ein Wachstum der Dendriten sowie ein Anstieg des totalen Gehirnvolumens nachweisen. Die zweite Phase beginnt nach dem ersten Lebensjahr und reicht bis zur Adoleszenz. Diese zeichnet sich durch einen langsamen Abfall von Neuronen, der synaptischen Dichte und einem Anstieg des Wachstums der Dendriten aus (Huttenlocher, 1979b; Webb et al., 2001).

Die Überproduktion in der Synaptogenese auch Spreading genannt, findet nicht nur bei den Synapsen, sondern auch bei den Dendriten, Axonen und dendritischen Spines statt. Diesen Wachstum von Dendritenbäumen konnte man im ersten postnatalen Lebensjahr in allen Schichten des Kortexs nachweisen (Webb et al., 2001). Im somatosensorischen Kortex konnte man bei WT-Mäusen von der ersten bis zur vierten Lebenswoche einen Anstieg der Spinedichte um das 2,5 fache nachweisen (Nimchinsky et al., 2001).

Unsere Ergebnisse zeigen bei den WT-Mäusen und bei den KO-Mäusen sowohl in der CA1 als auch in der CA3 Region des Hippocampus ein Spreading. Bei den WT-Mäusen vollzog sich der Anstieg der Synapsen bis zur dritten Lebenswoche mit einem prozentualen Anstieg in der CA1 Region von 46 % und in der CA3 Region von 25 %. Bis zur dritten Lebenswoche zeigte sich bei den KO-Mäusen ein prozentualer Anstieg in der CA1 Region von 46 % und in der CA3 Region von 26 %. Jedoch stieg die Spinesynapsenanzahl sowohl in der CA1 Region als auch in der CA3 Region in der folgenden Lebenswoche (vierten Lebenswoche) weiter an, was auf eine verlängerte bzw. stärkere Spreadingphase hinweisen könnte. Der prozentuale Anstieg, ausgehend von der vollständigen Spreadingphase der KO-Mäuse, stellte sich in der CA1 Region mit 48 % und in der CA3 Region mit 31 % dar.

Im Hippocampus scheint die Synaptogenese generell sehr früh schon vor den ersten Interaktionen mit der Umwelt und kognitiven Funktionen zu beginnen. Dementsprechend konnte man im Hippocampus asymmetrische und axodendritische Synapsen bereits bei Embryonen in der 15. Schwangerschaftwoche aufzeigen (Kostovic et al., 1989).

Warum produziert das Gehirn nunmehr erst soviele Synapsen, um sie dann wieder zu beseitigen? Ein Ansatzpunkt ist, dass sich das Gehirn durch das Spreading für den Empfang von Informationen aus der Umwelt bereit macht (Webb et al., 2001). Ein weiterer Punkt ist, dass Verletzungen und Malformationen kompensiert werden können, da besonders das erste Lebensjahr eine kritische und vulnerable Phase darstellt (Huttenlocher, 1984). Daneben scheint das Spreading wichtig für die kognitive und allgemeine Entwicklung des Gehirns zu sein (Goldman-Rakic, 1987).

Inmitten der postnatalen Entwicklung wird nach dem anfänglichen Anstieg der Synapsendichte diese nunmehr physiologisch nach dem Prinzip "use it or lose it" reduziert, wobei sowohl das Spreading als auch das Pruning in den verschiedenen Regionen des Kortexs sehr heterogen verlaufen (Huttenlocher & Dabholkar, 1997). Das Pruning beginnt beim Menschen nach dem zweiten Lebensjahr. Es werden im gesamten Kortex annähernd 40 % der in der Synaptogenese gebildeten Synapsen eliminiert (Huttenlocher & Dabholkar, 1997). Im Hippocampus dezimiert sich während des Prunings die Synapsendichte im Durchschnitt um 10-15 % (Meyer & Ferres-Torres, 1978; Grossman et al., 2006).

Unsere Daten stimmen mit den vorausgegangenen Untersuchungen überein. Die WT-Mäuse wiesen kontinuierlich in beiden untersuchten Regionen weniger Spinesynapsen zwischen der dritten Lebenswoche und zwölften Lebenswoche auf. In der CA1 Region wurden die Spinesynapsen um 50 % gesenkt und in der CA3 Region um 52 %. Die KO-Mäuse hingegen wiesen erst nach der vierten Lebenswoche eine Abnahme der Spinesynapsendichte auf, wohingegen aber das Pruning insgesamt nicht nur verspätet, sondern auch auf einem niedrigeren Niveau abgelaufen ist. Dementsprechend zeigte sich in der CA1 Region eine Abnahme von der vierten zur zwölften Lebenswoche von lediglich 20 % und in der CA3 Region von lediglich 24 %, sodass man insgesamt sehen kann, dass das Pruning bei den KO-Mäusen mit der PAH-Defizienz weniger als halb so erfolgreich verlief.

Von Pruning spricht man, wenn in der postnatalen Entwicklung auf die Phase des Spreadings, eine Phase der Reduktion von Synapsen folgt. Es ist nicht nur schlicht ein Verlust von Synapsen, sondern eine umweltbedingte Änderung der Spinedichte pro dendritischer Länge und kein Verlust des ganzen Neurons. Das Pruning folgt der schnellen Synaptogenese in der Kleinkindzeit mit einem Plateau in der Kindheit, sodass in der späten Kindheit und der Adoleszent die Synapsen eliminiert werden (Huttenlocher & Dabholkar, 1997; Webb et al., 2001).

69

Eine mögliche Rolle bei der Regulation des Prunings konnte man den präsynaptischen Neurotransmittern nachweisen, welche eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung und Modulation der Aktivität von kortikalen Neuronen spielen und so durch eine Änderung in der Verteilung von exzitatorischen und inhibitorischen Inputs zum Pruning führen können (Kostovic, 1990; Webb et al., 2001).

So konnten Diebler et al. (1979) einen Zusammenhang zwischen der Konzentration des inhibitorischen Neurotransmitters GABA und der Elimination von Synapsen zeigen, was auf einen möglichen Steuerungsprozess durch diesen hinweisen könnte. Dabei zeigte sich, dass während des ersten Lebensjahres, während der Zeit des Spreadings, die Konzentration von GABA hoch war mit Maxium am Ende des ersten Lebensjahres. Weiter nimmt danach während der Phase des Prunings auch die Konzentration des Neurotransmitters GABA ab (Diebler et al., 1979; Webb et al., 2001).

Des Weiteren kann das Pruning durch eine begrenzte Verfügbarkeit von neurotrophen Faktoren verursacht werden. Dies konnte bei spezifischen Neurotrophinen wie NGF, NT-3, BDNF- und Thyreoliberin beobachtet werden (Patterson & Nawa, 1993; Webb et al., 2001).

Demgemäß werden lediglich elektrisch aktive Synapsen, die mit synaptischen Faktoren antworten, am Leben erhalten und unbenutzte Synapsen, die nicht in den elektrischen Schaltkreis eingebaut sind, abgebaut (Changeux & Danchin, 1976; Webb et al., 2001). Infolgedessen fallen allein ungeeignete dendritische Spines dem Pruning zum Opfer, sodass die Verzweigung der geeigneten dendrititischen Spines in Größe und Komplexität zunimmt (Webb et al., 2001).

Des Weiteren konnte der Mikroglia eine Bedeutung beim Pruning zugewiesen werden, denn Mäuse deren Gen für die Mikroglia (Fractalkine Cx3cr1) ausgeschaltet worden ist, zeigten in der CA1 Region des Hippocampus im Vergleich zum WT ein verzögertes Eintreten des Prunings (Paolicelli et al., 2011). Bisher ist aber noch weiterhin unklar, ob das Pruning ein aktiver, durch Zunahme der synaptischen Aktivität, oder ein passiver, durch einen Mangel an afferenten Aktivitäten, Prozess ist (Segal et al., 2000).

In Gehirnen von Vögeln zeigte sich das Pruning als ein aktiver Prozess mit Hemmung des NMDA-Rezeptors (Bock & Braun, 1999). Pruning könnte auch ein Zell-spezifisches Phänomen sein, da die verschiedenen neuronalen Zellen es zu unterschiedlichen Zeiten in der postnatalen Entwickelung durchführen (Segal et al., 2000).

8.2 Warum könnte das Pruning bei der PKU gestört sein?

Das Pruning ist ein komplexer Prozess, sodass die genaue Regulierung bislang noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Auch ist das Pruning, wie oben beschrieben, ein heterogener Prozess, der in Ausprägung, zeitlichem Ablauf und den einzelnen Spezies unterschiedlich zu sein scheint (Huttenlocher, 1984; Huttenlocher & Dabholkar, 1997).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind teils kontrovers zu in der Literatur gefundenen Prozessen, welche das Pruning steuern. Sonach zeigt sich bei Patienten mit unbehandelter PKU in verschiedenen Untersuchungen, dass besonders ein Mangel an Monoamin-Neurotransmittern herrscht (McKean et al., 1968; Pardridge, 1998; Puglisi-Allegraet al., 2000; Surtees & Blau, 2000). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Spinedichte und Länge der Dendriten in der CA1 Region des Hippocampus ansteigt, wenn man Ratten in den ersten Lebensmonaten mit Serotonin und Noradrenalinwiederaufnahmehemmern behandelt (Norrholm & Ouimet, 2000). Daraus würde sich ergeben, dass die KO-Mäuse durch den Monoaminmangel weniger Synapsen als die WT-Mäuse aufweisen müssten.

Bock & Braun (1999) konnten zeigen, dass das Pruning in Vogelgehirnen durch die Blockade des NMDA-Rezeptors reguliert wird. In Rattenkulturen konnte dargestellt werden, dass hohe Phenylalaninkonzentrationen den NMDA-Rezeptor allosterisch hemmen (Glushakov et al., 2002). Des Weiteren konnten Glushakov et al. (2005) nachweisen, dass durch chronisch erhöhte Phenylalaninkonzentrationen, die Anzahl der Glutamatrezeptoren unter anderen des NMDA-Rezeptors ansteigen. Daher könnte durch die Störung und die mögliche höhere Anzahl an NMDA-Rezeptoren bei hohen Phenylalaninkonzentrationen auch die Störung des Prunings erklärt werden, jedoch müssten dafür die Ergebnisse von Vögeln auf Säugetiere übertragbar sein.

8.3 <u>Führt die quantitative Veränderung der Synapsen zu einer besseren</u> <u>Hippocampusfunktion?</u>

Folgend ist zu diskutieren, ob die KO-Mäuse durch ihre signifikant höhere Synapsenzahl auch eine bessere synaptische Übertragung bzw. die Störung des Prunings eine reaktive Reaktion aufgrund einer Funktionseinschränkung der Synapsen sein könnte. Könnte die erhöhte Spinesynapsendichte einen Einfluss auf funktionelle Parameter der Mäuse haben?

Lacey (1984) entdeckte im Stratum radiatum der CA1 Region eine erhöhte Anzahl an Spinesynapsen bei 60 Tage alten Ratten, welche er zuvor mit Phenylacetat behandelte. Des Weiteren untersuchte er auch die Qualität der Spinesynapsen. Dort stellten sich die Spines lang und dünn dar, vergleichbar mit Spines, die in dieser Region im 2.Trimenon gebildet werden.

Dieser Studie liegt allein die Quantität der Spinesynapsen zu Grunde, sodass eine weitere qualitative Analyse der Spinesynapsen in der Mutante im Rahmen weiterer Forschung sinnvoll wäre. Handelt es sich bei der gefunden Erhöhung der Synapsen bei den KO-Mäusen konkret um reife funktionsfähige Synapsen oder vielmehr auch wie bei Lacey's gefundenen Ergebnissen um unreife Synapsen? Unreife Synapsen können nur abgeschwächte synaptische Potentiale übertragen, sodass die Übertragung im Hippocampus gestört sein könnte. Um dies weiter zu überprüfen, wären elektrophysiologische Messungen im Hippocampus der KO-Maus im Vergleich zu der WT-Maus sinnvoll, so könnte man die Funktionsfähigkeit der Synapsen überprüfen. Kurze tetanische Stimulationen führen im Hippocampus durch Langzeitpotenzierung (LTP) zur synaptischen Plastizität, welche für Stunden bis Tage andauern kann (Bliss & Lømo, 1973). Nach hoch frequentierter Stimulation der Schafferkollaterale in der CA1 Region in vivo und in vitro konnte man 33-50 % mehr synaptische Kontakte an den dendritischen Schaften nachweisen, jedoch konnte kein Unterschied in der Anzahl der Spinesynapsen und der Länge und Größe der postsynaptischen Dichte gefunden werden, zumal durch LTP ein Anstieg der synaptischen Innervation von inhibitorischen Interneurone gefunden wurde (Lee et al., 1979a; Lee et al., 1979b).

Die ersten elektrophysiologischen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Rune mit unseren KO-Mäusen zeigten einen signifikanten Unterschied in der LTP im Vergleich

72
zu den WT-Mäusen, sodass eine Funktionseinschränkung durch unreife Synapsen zu bestehen scheint.

Ein weiterer Punkt, der Rückschlüsse auf funktionelle Parameter schließen lassen könnte, wären verhaltensbiologische Untersuchungen der KO-Mäuse im Vergleich zu der WT-Maus. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass bisher bei der auch in meinen Untersuchungen verwendeteten Pah^{enu2}-Maus keine schweren kognitiven Defizite nachweisbar waren (Zagreda et al., 1999; Mihalick et al., 2000). Es zeigten sich jedoch Defizite im Spatial Novelty Test (SNT), der das räumliche Denken prüft, und im Objects Recognition Test (ORT), welcher die Erinnerungfähigkeit an Gegenstände prüft. Beide Tests prüfen insbesondere die Funktionsfähigkeit des Hippocampus (Cabib et al., 2003). Allerdings sind die für meine Untersuchungen benutzten KO-Mäuse nicht wie die von Cabib et al. (2003) benutzten Pah^{enu2}-Mäuse vor dem Hintergrund von BTBR-Mäusen gezüchtet worden, sondern direkt auf den WT-Stamm C57/BI6, welche so dem WT-Stamm genetisch näher sind, als Pah^{enu2}-Mäuse, welche vor dem Hintergrund der BTBR-Maus gezüchtet sind, sodass eine Wiederholung dieser Tests mit der C57/BI6 KO-Maus meiner Meinung nach sinnvoll wäre.

Als weiteren Test für das räumliche Denken könnte man die Mäuse noch dem "Water maze" (Wasser-Labyrinth) unterziehen, welcher speziell die Leistungsfähigkeit der CA1 Region des Hippocampus überprüft (Morris, 1981; Morris et al., 1982). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wären interessant, um eine funktionelle Auswirkung der erhöhten Synapsenzahl beurteilen zu können.

8.4 Anstieg der Synapsen in der Generation der 35 Wochen

Ein weiterer interessanter Punkt in dieser Arbeit ist, dass die Synapsenanzahl sowohl in der CA1 Region als auch in der CA3 Region im Alter von 35 Wochen im Vergleich zu der im Alter von 12 Wochen (der letzten Messung zuvor) zunimmt. Nach dem Prozess des Prunings, der wie oben beschrieben, mit einer Abnahme der Synapsen einhergeht, steigt die Zahl der Synapsen wieder an. Dieser Effekt ist sowohl bei der WT-Kontrollgruppe als auch bei den KO-Mäusen nachweisbar. In der CA1 Region steigt die Synapsenzahl bei den KO-Mäusen um 23 % an und bei den WT-Mäusen um 50 %, wobei die 12 Wochen alten KO-Mäuse durch die signifikant höhere Synapsenanzahl auf einem höheren Level starten. In der CA3 Region steigt die Synapsenzahl bei den KO-Mäusen um 29 % und bei den WT-Mäusen um 58 %, wobei auch hier wieder das Äquivalente wie für die CA1 Region gilt.

Ein möglicher Ansatzpunkt für die Steigung der Synapsenzahl bei der Generation der 35 Wochen ist ein reaktiver Anstieg der Synapsenzahl durch Lernprozesse.

Während eines Anstieges der neuronalen Aktivität kann auch ein Anstieg der Spinesynapsen nachgewiesen werden (Globus & Scheibel, 1967; Valverde, 1967; Valverde, 1971). Ebenso führt die Haltung von Tieren in komplexeren Umgebungen beispielhaft zu einer Steigerung der dendritischen Verzweigungen im Ocipitallappen von Ratten (Greenough & Volkmar, 1973). Darüber hinaus nimmt die Spinedichte an den basalen Dendriten der CA1 Region zu, wenn man Ratten in einem Käfig mit Spielzeug hält (Moser et al., 1997). Im Gyrus dentatus von Mäusen konnte man durch Umweltstimulation einen Neuronenanstieg von rund 67 % nachweisen, sodass man nicht nur, wie in dieser Arbeit, die Synapsenentwicklung, sondern auch die Neurogenese beobachten und bewerten sollte (Kempermann et al., 1998).

Die Mäuse dieser Arbeit wurden in keiner komplexeren Umwelt gehalten, jedoch wurden in der Literatur auch keine Mäuse in diesem Alter auf diese Fragestellung hin untersucht. Könnte der Anstieg so ein physiologischer Anstieg im Alter sein? Auch hier wäre abermals eine elektrophysiologische Analyse interessant, in welchem Ausmaß die Synapsen bei diesen relativ alten Tieren in ihrer Funktion eingeschränkt sein könnten. Des Weiteren wäre ebenfalls interessant, ob sich die älteren Mäuse in verhaltensbiologischen Untersuchungen anders als ihre jüngeren Mäuse verhalten. Darüber hinaus wäre es wissenswert, ob die Synapsen bei noch älteren Mäusen weiter ansteigen bzw. diese erhöhte Anzahl an Synapsen bei diesen Mäusen

Letztendlich könnte dieser Effekt evtl. auch durch einen methodischen Fehler verursacht sein. Die Fotos der 35 Wochen alten Mäuse waren qualtitativ hochwertiger als die anderen Fotos, wobei jeweils in der Qualität von den 2 Wochen-12 Wochen kein Unterschied zu erkennen war. Die Gehirne der 35 Wochen waren am ehesten besser perfundiert und so war das Gewebe dieses Jahrgangs besser erhalten und auf diese Weise die Bilder von besserer Qualität. Allerdings war der Anstieg so stark ausgeprägt, dass dies nicht die alleinige Ursache des Anstiegs im Alter sein kann.

8.5 <u>Einordnung der Ergebnisse im Vergleich zu anderen Erkrankungen, die mit</u> <u>einer mentaler Retardierung einhergehen</u>

Neuroanatomische Untersuchungen an Patienten mit mentaler Retardierung zeigten häufig dendritische Anomalitäten (Purpura, 1974). Generell findet man bei mentaler Retardierung eine Pathologie der Dendriten und in Einzelfällen eine Reduktion der dendritischen Verzweigung mit einer Verminderung der kortikalen postsynaptischen Fläche (Kaufmann & Moser, 2000). So möchte ich im Folgenden auf drei Erkrankungen, welche als zentrales Symptom die mentale Retardierung zeigen, eingehen, als erstes auf den Morbus Down, als zweites auf das Rett-Syndrom und zuletzt auf das fragile X-Syndrom.

Untersuchungen an sieben Patienten mit Morbus Down im Hippocampus zeigten eine signifikant reduzierte Spinezahl in den mittleren und distalen Segmenten der apikalen Dendriten (Kaufmann & Moser, 2000). Diese Ergebnisse sind eher Down-Syndrom spezifisch, da bei Untersuchungen an Patienten mit unspezifischer mentaler Retardierung keine Senkung der Zahl der dendritischen Spines gefunden worden ist (Suetsugu & Mehraein, 1980). Des Weiteren fand man bei Untersuchungen an den Pyramidenzellen der Hippocampusregionen CA1-CA3 bei Patienten mit Morbus Down ohne gleichzeitige Morbus Alzheimer Erkrankung eine Reduktion der Spinezahl in allen Regionen im Vergleich zu Gesunden, dabei fiel die Reduktion in der CA1 Region bei Patienten mit Morbus Down und Morbus Alzheimer am größten aus (Ferrer & Gullotta, 1990). Eine weitere Untersuchung am visuellen Kortex von Patienten mit Morbus Down ergab, dass nur bei Neugeborenen und älteren Kindern eine Senkung der dendritischen Spines nachgewiesen werden konnte, welche bei Feten und Kleinkindern nicht zu finden waren (Takashima et al., 1981).

Das Rett-Syndrom zeigt eine erhöhte neuronale Dichte und eine Reduktion der Perikaryongröße der Neuronen (Bauman et al., 1995). Man fand eine Korrelation bei der Stärke der Veränderung an den Dendriten und dem Ausmaß der mentalen Retardierung. Das fragile X-Syndrom wird durch einen Defekt des Gens FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1) ausgelöst, welches auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Das FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein), das wichtig für eine normale Synapsenreifung und das Pruning ist, steht auf diese Weise dem ZNS nicht in ausreichender Konzentration zur Verfügung (Galvez & Greenough, 2005), wobei diese Erkrankung beim männlichen Geschlecht mit einem stärkeren Phänotyp einhergeht (Wisniewski et al., 1991). Werden nun Mäuse untersucht, bei welchen das FMR1-Gen wie beim fragilen X-Syndrom ausgeschaltet ist, stellt man fest, dass adulte KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen im Hippocampus über mehr unreife Spines verfügen (Grossman et al., 2006).

Die Reifung von Synapsen äußert sich im Hippocampus durch den Anstieg von *mushroom* Spines und dem Abfall von *thin* Spines (Grossman et al. 2010). Des Weiteren weisen die Fmr1-KO-Mäuse im Hippocampus eine höhere Anzahl an längeren und eine geringere Anzahl an kürzeren Spines auf, was auch ein Indiz für Unreife darstellt (Grossman et al., 2006). Auch bei Patienten mit fragilem X-Syndrom konnte man annormal lange dendritische Spines mit einer erhöhten Spinedichte im Temporallappen und visuellen Kortex (Irwin et al., 2001), im Gyrus cingulus und Temporallappen (Hinton et al., 1991) nachweisen.

Zwischen dem 25. und 73-76. Lebenstag fällt bei den WT-Mäusen im somatosenorischen Kortex im Rahmen des Prunings die Spinedichte ab und auch die Länge der Spines nimmt ab, was für die kortikale Reifung spricht. Die KO-Mäuse zeigen im somatosensorischen Kortex sowohl eine Spinedichte als auch eine Länge im Alter von 75 Lebenstagen, welche auf einem vergleichbar hohen Niveau wie bei den 28 Tage alten KO-Mäusen ist (Galvez & Greenough, 2005).

Eine weitere Studie am somatosensorischen Kortex konnte zeigen, dass sowohl die Spinelänge als auch die Spinedichte im Verlauf der Entwicklung von der ersten Lebenswoche zur vierten Lebenswoche abnimmt bzw. kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur WT-Gruppe nachzuweisen ist (Nimchinsky et al., 2001). Dies könnte daraufhin weisen, dass die Störung der Spineentwicklung erst nach dem ersten Lebensmonat beginnt.

Kurz zusammengefasst heißt dies: Beim fragilen X-Syndrom ist das Pruning nach dem ersten Lebensmonat gestört, man findet signifikant mehr unreife Spines und dies in verschiedenen Regionen des Kortexs. Außerdem weisen Patienten mit dieser Erkrankung als zentrales Symptom die mentale Retardierung auf. Im Vergleich mit dem fragilen X-Syndrom sind unsere Ergebnisse ähnlich.

Denn das Pruning scheint gestört zu sein, was bei dieser Arbeit ab der vierten Lebenswoche mit einem signifikanten Unterschied beginnt. Des Weiteren steht auch bei der PKU die mentale Retardierung als zentrales Symptom im Mittelpunkt. Auf diese Weise kommt die Frage auf, ob ein gestörtes Pruning zu einer mentalen Retardierung führt bzw. ob dies vielleicht ein Punkt von vielen noch unbekannten ist, der zur mentalen Retardierung führen könnte. Wie oben schon beschrieben, drängt sich hier die Wichtigkeit einer qualitativen Untersuchung der Spines auf, um letztlich zu klären, ob auch bei der PKU die Anzahl unreifer Spines wie beim fragilen X-Syndrom erhöht sein könnte.

Im Weiteren konnte man beim fragilen X-Syndrom die Unreife und Störung des Prunings auch in anderen Hirnarealen nachweisen, sodass es interessant wäre, Regionen, die beim fragilen X-Syndrom auffallend waren, auch bei den Mutanten dieser Studie zu untersuchen, um das Ausmaß der Störung erfassen zu können. Die gegensätzlichen Ergebnisse beim Morbus Down verdeutlichen, wie komplex die mentale Retardierung zu sein scheint und wie viele "Gesichter" sie zu haben scheint.

8.6 <u>Einordnung der Ergebnisse in den Stand der PKU-Forschung</u>

Liang et al. (2011) untersuchten die dendritischen Spines und Synapsen im präfrontalen Kortex und in der CA1 Region des Hippocampus anhand der BTBR-PAH^{enu2} -Maus und verglichen dies mit WT-Mäusen und heterozygoten Mäusen aus dieser Reihe. Sie untersuchten ausschließlich männliche Mäuse im Alter von 2 Wochen, 2 Monaten und 8 Monaten in den drei o.g. Gruppen und verglichen sie.

Die 2 und 8 Monate alten KO-Mäuse wiesen eine signifikant erniedrigte synaptische Dichte auf und bei den 2 Wochen alten KO-Mäusen konnte im Vergleich zur WT-Gruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Des Weiteren zeigten die KO-Mäuse in allen drei untersuchten Altersstufen eine Störung der synapstischen Ultrastruktur. Die präsynaptisch aktive Zone war in der Länge verkürzt, der synaptische Spalt verbreitert und die postsynaptische Dichte dünner. Außerdem untersuchten sie die Phosphorylierung der Thr286 von Ca²⁺ / Calmodulin abhängigen Proteinkinase IIα. Diese zeigte sich gestört, was für eine gestörte Funktion der Synapsen spricht. Zwischen den WT-Mäusen und den heterozygoten Mäusen konnte bei allen untersuchten Altersstufen kein signifikanter Unterschied in der synaptischen Dichte und in der Ultrastruktur nachgewiesen werden.

Aus der Studie geht leider nicht hervor, welchen WT-Stamm sie für ihre Untersuchungen genutzt haben. Des Weiteren haben sie die Dichte der dendritischen Spines nach Golgi-Färbung ermittelt und nutzten hierzu in Paraffin eingebettete Slices und zählten daraufhin von der ersten Verknüpfung der Dendriten die Spines über eine Länge von 10 µm in Richtung der apikalen Dendriten. Jedoch habe ich meine in Epon eingebetteten Proben über EM-Bilder stereologisch ausgezählt, sodass dies möglicherweise der entscheidene Punkt für die kontroversen Ergebnisse sein könnte. Für die Ultrastrukturanalyse nutzten sie in Epon eingebettete Proben, die Proben dieser Arbeit wurden bisher noch nicht weiter ultrastrukturell untersucht, wobei dies ein weiterer interessanter Ansatzpunkt wäre, um zu sehen, ob diese neuen Erkenntnisse mit den Ergebnissen von Liang et al. (2011) übereinstimmen.

Untersuchungen an postmortalen Gehirnen von Patienten mit PKU zeigten eine reduzierte Anzahl synaptischer Spines (Williams et al., 1980; Bauman & Kemper, 1982), wobei diese Untersuchungen an den kortikalen Pyramidenschichten und nach Golgi-Färbung durchgeführt worden sind. Jedoch konnte, wie oben bereits beschrieben, bei 60 Tage alten Ratten in der CA1 Region nach Phenylacetat Injektion eine erhöhte Synapsendichte und insgesamt ein höherer Anteil an unreifen langen *thin* Spines und eine verminderte Anzahl an *mushroom* Spines nachgewiesen werden (Lacey, 1984). Diese Ergebnisse zeigen ein mit meinen Ergebnissen vergleichbares Ergebnis im Gegensatz zu den darüber beschriebenen.

8.7 <u>Resümee</u>

Kurz zusammengefasst hat die vorliegende Arbeit gezeigt, dass in der CA1 und CA3 Region bei PAH^{enu2}-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen in der frühen Synapsenentwicklung (2. und 3. Lebenswoche) kein signifikanter Unterschied nachzuweisen ist, jedoch anschließend, wenn bei den WT-Mäusen das Pruning (ab der 4. Lebenswoche) beginnt, eine signifikant höhere Synapsenzahl feststellbar ist und dieser Unterschied auch noch bei adulten Mäusen (12. Lebenswoche)

78

nachzuweisen ist. Des Weiteren zeigen die alten Mäuse (35. Lebenswoche) wieder keinen signifikanten Unterschied in der Synapsenanzahl, gleichwohl ist die Synapsenanzahl insgesamt (bei WT-Mäusen und KO-Mäusen) wieder auf dem Niveau vergleichbar mit den Mäusen im Alter von 3 Wochen.

Insgesamt scheint bei den KO-Mäusen das Pruning verzögert und in geringeren Maß abzulaufen, vergleichbar mit Daten über das fragile X-Syndrom. Die Mäuse im Alter von 35 Wochen verzeichnen einen Synapsenanstieg, welcher teils durch Lernen bzw. einen möglichen physiologischen Anstieg der Synapsen im Alter und teils durch einen methodischen Fehler verursacht sein könnte.

Diese Arbeit wurde an den Pah^{enu2}-Mäusen, einem anerkanntem Modell für die humane PKU, durchgeführt (McDonald et. al., 2002), sodass zu überlegen ist, inwieweit die gefunden Ergebnisse auf den Menschen zu übertragen sind. Ist also das Pruning, welches im weitesten Sinne für eine Störung der kortikalen Reifung spricht, beim Patienten mit PKU ebenfalls gestört? Wenn man die Ergebnisse mit denen über das fragile X-Syndrom vergleicht - ja, denn dort konnte auch bei Menschen eine erhöhte Spinedichte nachgewiesen werden (Hinton et al., 1991; Irwin et al., 2001). Dies könnte ein möglicher Ansatzpunkt sein, um das komplexe Krankheitsbild, welches zur mentalen Retardierung bei Patienten mit PKU führt, zu erklären. Diese Arbeit kann so möglicherweise einen weiteren Aspekt der Pathogenese der PKU aufklären.

9 Zusammenfassung

Die Phenylketonurie ist eine angeborene Stoffwechselerkrankung mit einer Mutation im Gen der PAH. Patienten mit diesem Gendefekt zeigen als zentrales Symptom die mentale Retardierung. Studien zur Pathogenese dieses Symptoms weisen auf eine Störung der Dendritendifferenzierung, dendritischen Spines und Synapsen hin. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der pathologischen Erhöhung der Serum- und

Liquorspiegel der Aminosäure Phenylalanin auf die Zahl der Spinesynapsen in der CA1 und CA3 Region des Hippocampus, im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf der Etablierung von Spinesynapsen, während der postnatalen Entwicklung des Gehirns, untersucht.

Es wurde die von Shedlosky et al. (1993) etablierte Pah^{enu2}-Maus der Wildtyp-Maus des Stammes C57/BI6 gegenübergestellt und im Alter von 2, 3, 4, 8, 12 und 35 Wochen analysiert. Die Mäuse wurden hierzu perfundiert, die Hippocampi entnommen, die Proben für die Elektronenmikroskopie aufbereitet und schließlich die Bilder der EM stereologisch ausgewertet.

Die stereologische Auswertung der hippocampalen Schnitte wies in der 2. und 3. Lebenswoche in beiden untersuchten Regionen keinen signifikanten Unterschied in der Spinesynapsenzahl auf. Ab der 4. bis zur 12. Lebenswoche konnte bei den KO-Mäusen sowohl in der CA1 Region als auch in der CA3 Region eine signifikant höhere Spinesynapsenzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Weiter konnte man bei den KO-Mäusen im Alter von 35 Wochen keinen signifikanten Unterschied in der Spinesynapsenzahl nachweisen. Es zeigte sich, dass die Spinesynapsenzahl sowohl bei den WT-Mäusen als auch den KO-Mäusen in beiden untersuchten Regionen im Alter von 35 Wochen auf einem vergleichbaren Niveau der 3 Wochen alten Mäuse war.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass die KO-Mäuse einerseits eine leicht verlängerte Spreadingphase und andererseits ein gestörtes und verzögertes Pruning aufweisen. Der Synapsenanstieg im Alter von 35 Wochen könnte zum einen ein Lerneffekt und zum anderen ein methodischer Fehler aufgrund der qualitativ hochwertigeren Bilder sein. Eine Störung des Prunings konnte auch bei KO-Mäusen des fragilen X-Syndrom, einer Erkrankung, die auch mit einer mentalen Retardierung einhergeht, nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich dort auch eine qualitative Störung der Synapsen, welche sich durch unreife Spines auszeichneten.

10 Literaturverzeichnis

- Alvord E.C., Stevenson L.D., Vogel F.S., Engle R.L. 1950. Neuropathologic findings in phenyl-pyruvic oligophrenia (phenylketonuria). *J Neuropathol Exp Neurol, 9: 298-310.*
- Arbeitgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörung, ABS (03/2010-03/2015). Konfirmationsdiagnostik bei Verdacht auf angeborene Stoffwechselerkrankung aus dem Neugeborenenscreening (Leitlinien der Gesellschaft Kinderheilkunde Jugendmedizin). für und AWMF (Arbeitgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften) Nr. 027/021.
- Bauman, M.L. & Kemper, T.L. 1982. Morphologic and Histoanatomic Obervations of the Brain in Untreated Human Phenylketonuria. *Acta Neuropathol (Berl), 58: 55-63.*
- Bauman M.L., Kemper T.L., Arin D.M. 1995. Pervasive neuroanatomic abnormalities of the brain in three cases of Rett's syndrome. *Neurology*, *45:* 1581-1586.
- Bechar M. 1965. Phenylketonuria presenting an intermittent progressive course. *J Neurol Neurosurg Psychiat, 28: 165-170.*
- Benda C. 1952. Developmental disorders of mentation and cerebral palsy. New York: Grune and Stratton.
- Bick U., Ullrich K., Stöber U., Miller H., Schuierer G., Ludolph A.C., Oberwittler C., Weglage J., Wendel U. 1993. White matter abnormalities in patients with treated hyperphenylalaninaemia: magnetic resonance relaxometry and proton spectroscopy findings. *Eur J Pediatr, 152*: 1012-1020.
- Bliss T., & Lømo T. 1973. Long-lasting potentiation potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol 232*: 331-356.
- Bock J., & Braun K. 1999. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptor activation suppresses learning-induced synaptic elimination Blockade of N-methyl-D-aspartate. *Proc Natl Acad Sci USA, 96*: 2485-2490.

- Burgard P., Bremer H.J., Bührdel P., Clemens P.C, Mönch E., Przyrembel H., Trefz F.K., Ullrich K. 1999. Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria 1997. *Eur J Pediatr, 158*: 46-54.
- Buselmaier W. & Tariverdian G. 2007. *Humangenetik 4.Auflage.* S. 64-75; 275. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Butler I.J., O'Flynn M.E., Seifert W.E. Jr., Howell R.R.1981 Neurotransmitter defects and treatment of disorders of hyperphenylalaniemia. *J Pediatr, 98:* 729-733.
- Cabib S., Pascucci T., Ventura R., Romano V., Puglisi-Allegra S. 2003. The behavioral Profile of Severe Mental Retardation in an Genetic Mouse Model of Phenylketonuria. *Behavior Genetics , Vol. 33, No. 3:* 301-310.
- Changeux J. & Danchin A. 1976. Selective stabilization of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature, 64, 5588*: 705-712.
- Christ, S.E. 2003. Asbjørn Følling and the Discovery of Phenylketonuria. *Journal of the History of the Neurosciences Vol. 12, No. 1*: 44-54.
- Cipcic-Schmidt S., Trefz F.K., Fünders B., Seidlitz G., Ullrich K. 1996. German Maternal Phenylketonuria Study. *Eur J Pediatr 155 [Suppl 1]:* 173-176.
- Cordero M.E., Trejo M., Colombo M., Aranda V. 1983. Histological maturation of the neocortex in phenylketonuric rats. *Elsevier, Early Human Development, 8: 157-173.*
- Crain B., Cotman C., Taylor D., Lynch G. 1973. A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis . *Brain Research, 63: 195-204*.
- Crome L. & Pare C.M.B. 1960. Phenylketonuria, a review and a report of the pathological findings in four cases. *J Ment Sci 106: 862-883*.
- Crome, L. 1962. The association of phenylketonuria with leukodystrophy. J Neurol Neurosurg Psychiat 25: 149-153.

- Curtius H.C., Baerlocher K., Vollmin J.A. 1972. Pathogenesis of phenylketonuria: inhibition of DOPA and catecholamine synthesis in patients with phenylketonuria. *Clin Chim Acta* 42: 235-239.
- DGNS (Deutsche Gesellschaft für Neugeborenenscreening). 2012. Nationaler Screening Report 2010 der DGNS.
- Diebler M., Farkas-Bargeton E., Wehrle R. 1979. Developmental changes of enzymes associated with energy metabolism and the synthesis of some neurotransmitters in discrete areas of human neocortex. *Journal of Neurochemistry*, 32: 429-435.
- Dyer C.A., Kendler A., Philibotte T., Gardiner P., Cruz J., Levy H. L. 1996. Evidence for central nervous system glial cell plasticity in phenylketonuria. *J Neuropathol Exp Neurol 55(7): 795-814*.
- Fellman J.H. 1958. Epinephrine metabolites and pigmentation in the central nervous system in a case of phenylpyruvic oligophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiat 21: 58-62*.
- Ferrer I. & Gullotta F. 1990. Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol 79: 680-685*.
- Følling A. 1934. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 227: 169-176.
- Galvez R. & Greenough W.T. 2005. Sequence of abnormal dendritic spine development in primary somatosensory cortex of a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome. *Am J Med Genet A 135:* 155-160.
- Globus A. & Scheibel A. 1967. The effect of visual deprivation on cortical neurons: a Golgi study. *Exp Neurol 19:* 331-345.
- Glushakov A.V., Dennis D.M., Morey T.E., Sumners C., Cucchiara R.F., Seubert C.N., Martynyuk A.E. 2002. Specific inhibition of N-methyl-Daspartate rezeptor function in rat hippocampal neurons by L-phenylalanine at concentrations observed during phenylketonuria. *Molecular Psychiatry 7: 359-367*.

- Glushakov A.V., Dennis D.M., Sumners C., Seubert C.N., Martynjuk A.E. 2003. L-Phenylalanine Selectively Depresses Currents at Glutamatergic Excitatory Synapses. *Journal of Neuroscience Research* 72: 116-124.
- Glushakov A.V., Varshney M., Bajpai L.K, Sumners C., Laipis P.J., Embury J. E., Baker S.P., Olero D.H., Dennis D.M., Seubert C.N., Martynjuk A.E. 2005. Long-term changes in glutamateric synaptic transmission in Phenylketonuria. *Brain, 128: 300-307.*
- Goldman-Rakic P. 1987. Development of cortical circuitry and cognitive function. *Child Development, 58*: 601-622.
- Greenough, W.T. & Volkmar F.R. 1973. Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. *Exp Neurol 40:* 491-504.
- Grossman A.W., Elisseoua N.M., McKinneya B.C., Greenough W.T. 2006. Hippocampal pyramidal cells in adult Fmr1 knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines. *Brainresearch, 1084:* 158-164.
- Grossman A.W., Aldridgea G.M., Leeg K.J., Zemana M.K. 2010. Developmental characteristics of dendritic spines in the dentate gyrus of Fmr1 knockout mice. *Brainresearch*, *1355*: 221-227.
- Guthrie R. & Susi A. 1963. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria; in a large population of newborn infants. *Pediatrics, Vol 32*: 318-343.
- Harris K.M. & Stevens J.K. 1988. Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: Serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *Neurosci, 8: 4455-4469*.
- Harris K.M. & Stevens J.K. 1989. Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci, 9: 2982-2997*.
- Harris K.M., Jensen F.E., Tsao B. 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci 12: 2685-2705*.

- Harris K.M., & Kater S.B. 1994. Dendritic Spines Cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic funktion. *Annual Review of Neuroscience*, 17: 341-371.
- Heuer J.C. Träume und die Biologie des Unbewussten. 2008. Moderne Psychoanalyse,Neurophysiologie. http://neuropsychoanalyse2012.wordpress.com/2008/02. [Stand: 15.06.2013, 12:00 Uhr].
- Hinton V.J., Brown W.T., Wisniewski K., Rudelli R.D. 1991. Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am J Med Gene. 41:* 289-294.
- Hörster F., Schwab M.A., Sauer S.W., Pietz J., Hoffmann G.F., Okun J.G., Kölker S., Kins, S. 2006. Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice. *Pediatric Research Vol. 59, No. 4*: 544-548.
- Huttenlocher P.R. 1979b. Synaptic density in human frontal cortex-Developmental changes and effects of aging. *Brain Research, 163*: 195-205.
- Huttenlocher P.R. 1984. Synapse elimination and plasticity in developing human cerebral cortex. *American Journal of mental deficiency, 88*: 488-496.
- Huttenlocher P.R. & Dabholkar A.S. 1997. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, *387*: 167-178.
- Huttenlocher P.R. 2000. The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. *Eur J Pediatr 159 [Suppl 2]: 102-106*.
- Irwin S.A., Patel B., Idupulapati M., Harris J.B., Crisostomo R.A., Larsen B.P., Kooy F., Willems P.J., Cras P., Kozlowski P. B., Swain R.A., Weiler I.J., Greenough W.T. 2001. Abnormal Dendritic Spine Characteristics in the Temporal and Visual Cortices of Patients With Fragile-X Syndrome: A Quantitative Examination. *American Journal of Medical Genetics 98:* 161-167.
- Jervis G.A. 1937. Phenypyruvic oligophrenia: Introductory study of fifty cases of mental deficiency associated with excretion of phenylpyruvic acid. *Archives of Neurology and Psychiatry 38*: 944-963.

- Jervis G.A. 1953. Phenylpyruvic oligophrenia: deficiency of phenylalanine oxidizing system. *Proc Soc Exp Biol Med, Vol 82*: 514-515.
- Kahle W., Frotscher M. 2001. Taschenatlas der Anatomie. Band 3 Nervensystem und Sinnesorgane. 7. Auflage. Thieme, Stuttgart New York.
- Kaufmann W.E. & Moser H.W. 2000. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cerebral Cortex 10: 981-991*.
- Kempermann G., Brandon E.P., Gage F.H. 1998. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Current Biology, Vol 8, No 16*: 939-942.
- Kohlschütter B., Ellerbrok M., Merkel M., Tchirikov M., Zschocke J., Santer R., Ullrich K. 2009. Phenylalanine tolerance in three phenylketonuric women pregnant with fetuses of different genetic PKU status. *J Inherit Metab Dis, 32* (*Suppl 1*): 1-4.
- Kostovic I., Seress L., Mrzljak L., Judas M. 1989. Early onset of synapse formation in the human hippocampus: a correlation with Nissl Golgi architectonics in 15- and 16,5-week old fetuses. *Neuroscience, 30*: 105-116.
- Kostovic I. 1990. Structural and histochemical reorganization of the human prefrontal cortex during perinatal and postnatal life. *Progress in Brain Research, 85*: 223-239.
- Lacey J.D. 1984. Hippocampal Dendritic Abnormalties in a Rat Model of Phenylketonuria. *Ann Neurol, 16: 577-580.*
- Lee K., Oliver M., Schottler F., Creager R., Lynch G. 1979a. Ultrastructural effetcs of repetitive synaptic stimulation in the hippocampal slice preparation: a preliminary report. *Exp Neurol, 65*: 478-480.
- Lee K.S., Schottler F., Oliver M., Lynch G. 1979b. Synaptic change associated with the induction of long-term potentiation. *Anat Rec, 193*: 601-602.
- Liang L., Gu X., Lu L., Li D., Zhang X. 2011. Phenylketonuria-related synaptic changes in a BTBR-Pahenu2 mouse model. *NeuroReport, 22:* 617-622.

- Lykkelund C., Nielsen J.B., Lou H.C., Rasmussen V., Gerdes A.M., Christensen E., Guttler F. 1988. Increased neurotransmitter biosynthesis in phenylketonuria induced by phenylalanine restriction or by supplementation of unrestricted diet with large amounts of tyrosine. *Eur J Pediatr, 148: 238-245*.
- Mayatepek E. 2007. Aminoazidopathien. *Pädiatrie 1. Auflage*. S. 208-211. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- McDonald J.D., Bode V.C., Taube W.F., Shedlovsky A. 1990. Pahhph-5: a mouse mutant deficient in phenylalanine hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci* USA, 87: 1965-1967.
- McDonald J.D. & Charlton C.K. 1997. Characterization of Mutations at the Mouse Phenylalanine Hydroxylase Locus. *Genomics*, *39*: 402-405.
- McDonald J.D., Andriolo M., Cal F., Mirisola M., Puglisi-Allegra S., Romano V., Sarkissian C.N., Smith C.B. 2002. The phenylketonuria mouse model: a meeting review. *Molecular Genetics and Metabolism, 76:* 256-261.
- McKean C.M., Boggs D.E., Peterson N.A. 1968. The influence of high phenylalanine and tyrosine on the concentrations of essential amino acids in brain. *J Neurochem*, 15: 235-241.
- Meyer G. & Ferres-Torres R. 1978. Quantitative age-dependent variations in dendritic spines in the hippocampus (CA1, CA3 and fascia dentata) of the albino mouse. *J Hirnforsch, 19:* 371-378.
- Mihalick S.M., Langlois J.C., Krienke J.D., Dube W.V. 2000. An olfactory discrimination procedure for mice. *J Exp Anal Behav*, *73(3)*: 305-318.
- Mitchell J. 2000, letztes Update 2013. *Phenylalanine Hydroxylase Deficiency.* Von GeneReviews Bookshelf ID: NBK1504; PMID: 20301677: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/. [Stand 01.02.2014, 18:00 Uhr].
- Modan-Moses D., Vered I., Schwartz G., Anikster Y., Abraham S., Segev R., Efrati O. 2007. Peak bone mass in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis, 30:* 202-208.

- Möller H.E., Weglage J., Bick U., Wiedermann D., Feldmann R., Ullrich K. 2003. Brain Imaging and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy in Patients with Phenylketonuria. *Pediatrics, Vol. 112, Nr. 6*: 1580-1583.
- Morris R.G.M. 1981. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation, Vol. 12, Nr.2:* 239-260.
- Morris R.G.M., Garrud P., Rawlins J.N.P., O'Keefe J. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature, 297, (5868)*: 681-683.
- Moser, H.W. 1995. A role for gene therapy in mental retardation. Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews, *1: 4-6*.
- Moser M.B., Trommald M., Egeland T., Andersen P. 1997. Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *J Comp Neurol, 380:* 373-381.
- Mülling K.W., Veterinär-Anatomisches Institut Leibzig.http://www.unileipzig.de/~vetana/Hippocampus/hippocampus.html; [Stand 01.06.2013, 16:00 Uhr].
- Nimchinsky E.A., Oberlander A.M., Svoboda K. 2001. Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci, 21: 5139-5146*.
- Nimchinsky E.A., Sabatini B.L., Svoboda, K. 2002. Structure and function of dendritic spines. *Annual Review of Physiology, 64: 313-353*.
- Norrholm S.D. & Ouimet C.C. 2000. Chronic fluoxetine administration to juvenile rats prevents ageassociated dendritic spine proliferation in hippocampus. *Brain Research, 883:* 205-215.
- Paans A.M.J., Pruim J., Smit G.P.A., Visser G., Willemsen A.T.M., Ullrich K. 1996. Neurotransmitter positron emission tomographic - studies in adults with phenylketonuria, a pilot study. *Eur J Pediatr, 155 [Suppl 1]*: 78-81.

- Paolicelli R.C., Bolasco G., Pagani F., Maggi L., Scianni M., Panzanelli P., Giustetto M., Ferreira T.A., Guiducci E., Dumas L., Ragozzino D., Gross C.T. 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Scienc*, 333: 1456-1458.
- Pardridge W.M. 1998. Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res, 23:* 635-644.
- Patterson P. & Nawa H. 1993. Neuronal differentiation factors/cytokines and synaptic plasticity. *Neuron, 10*: 123-137.
- Penrose L.S. & Quastel J.H. 1937. Metabolic studies in phenylketonuria. *Biochemical Journal, 31:* 266-274.
- Pérez-Dueñas B., Cambra F.J., Vilaseca M.A., Lambruschini N., Campistol J., Camacho J.A. 2002. New approach to osteopenia in phenylketonuric patients. *Acta Paediatr, 91*: 899-904.
- Peters A. & Kaiserman-Abramof I.R. 1970. The small pyramidal neuron of the ratcerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat, 127: 321-355.*
- Poser C.M. & von Bogaert L. 1959. Neuropathologic observations in phenylketonuria. *Brain, 82: 1-9*.
- Puglisi-Allegra S., Cabib S., Pascucci T., Ventura R., Cali F., Romano V. 2000. Dramatic brain aminergic deficit in a genetic mouse model of phenylketonuria. *NeuroReport, 11*: 1361-1364.
- Purpura D.P. 1974. Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation. *Science, 186: 1126–1128.*
- Ramón y Cajal S. 1904. La Textura del Sistema Nerviosa del Hombre y los Vertebrados. *Madrid: Moya*.
- Rassow J. 2012. Abbau von Aspartat, Phenylalanin und Tyrosin zu Fumarat und Acetoacetat. In J. H. Rassow et al., *Duale Reihe Biochemie 3. Auflage*, S. 154-155. Stuttgart: Thieme.

- Rey F., Abadie V., Plainguet F., Rey J. 1996. Long-term follow up of patients with classical phenylketonuria after diet relaxation at 5 years of age. *Eur J Pediatr, 155 [Suppl 1]*: 39-44.
- Reynolds E.S. 1963. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol, 17*: 208-212.
- Robinson M., White F.J., Cleary M.A., Wraith E., Lam W.K., Walter J.H. 2000. Increased risk of vitamin B12 deficiency in patients with phenylketonuria on an unrestricted or relaxed diet. *J Pediatr, 136*: 545-547.
- Rohen J.W. 2001. Funktionelle Neuroanatomie 6. Auflage. S. 160-162. Stuttgart: Schattauer GmbH.
- Roth G. 2001. Fühlen, Denken, Handeln. Wie das Gehirn unser Verhalten steuert. Frankfurt: Suhrkamp.
- Salize H.J., Fünders-Bücker B., Knorrek U., Mallmann R., Michel A., Pietsch V., Seidlitz G., Ullrich K., Widhalm K., Trefz F.K. 1991. Maternale PKU Risiken für das Ungeborene. Sozialpäidiatrie in Praxis und Klinik 13: 496-501.
- Sander G. 1951. Zur pathologischen Anatomic und Pathophysiologie des Gehirns bei der phenylpyruvischen Idiotic. *Thesis, Zürich. Jasonpers Universiteits pers, Amsterdam.*
- Sarkissian C.N., Boulais D.M., McDonald J.D., Scriver C.R., 2000. A heteroallelic mouse model: a new orthologue for human hyperphenylalaninemia. *Mol Genet Metab, 69:* 188-194.
- Schwahn B., Mokov E., Scheidhauer K., Lettgen B., Schönau E. 1998. Decreased trabecular bone mineral density in patients with phenylketonuria measured by peripheral quantitative computed tomography. *Acta Paediatr, 87*: 61-63.
- Schweitzer-Krantz S. & Burgard P. 2000. Survey of national guidelines for the treatment of phenylketonuria. *Eur J Pediatr, 159, [Suppl 2]:* 70-73.
- Segal M., Korkotian E., Murphy D.D. 2000. Dendritic spine formation and pruning: common cellular mechanisms? *Trends Neurosci, 23*: 53-57.

- Shedlosky A., Mc Donald J.D., Symula D., Dove W.F. 1993. Mouse Models of Human Phenylketonuria. *Genetics, 134*: 1204-1210.
- Steinfeld R., Kohlschütter A., Ullrich K., Lukacs Z. 2003. A hypothesis on the biochemical mechanism of BH₄-responsiveness in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Amino Acids*, 25: 63-68.
- Steinfeld R., Kohlschütter A., Ullrich K., Lukacs Z. 2004. Effciency of long-term tetrahydrobiopterin monotherapy in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis, 27*: 449-453.
- Suetsugu M. & Mehraein P. 1980. Spine distribution along the apical dendrites of the pyramidal neurons in Down's syndrome. A quantitative Golgi study. *Acta Neuropathol, 50: 207-210.*
- Surtees R. & Blau N. 2000. The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr, 159, [Suppl2]: 109-113.*
- Takashima S., Becker L.E., Armstrong D.L., Chan F. 1981. Abnormal neuronal development in the visual cortex of human fetus and infant with Down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain Res, 225: 1-21.*
- Valverde F. 1967. Apical dendritic spines of the visual cortex and light deprivation in the mouse. *Exp Brain Res, 3:* 337-352.
- Valverde F. 1971. Rate and extent of recovery from dark rearing in the visual cortex of the mouse. *Brain Res, 33:* 1-11.
- Webb S.A., Monk C.S., Nelson C.A. 2001. Mechanisms of postnatal neurobiological development: Implications for human development. *Developmental Neuropsychology*, *19*(*2*): 147-171.
- Weglage J., Pietsch M., Fünders B., Koch H.G., Ullrich K. 1995. Neurological findings in early treated phenylketonuria. *Acta Paediatr, 84(4)*: 411-415.
- Weglage J., Pietsch M., Fünders B., Koch H.G., Ullrich K. 1996a. Deficits in selective and sustained attention processes in early treated children with phenylketonuria result of impaired frontal lobe functions? *Eur J Pediatr, 155*: 200-204.

- Weglage J., Fünders B., Ullrich K., Rupp A., Schmidt E. 1996b. Psychosocial aspects in phenylketonuria. *Eur J Pediatr, 155, [Suppl 1]*: 101-104.
- Williams R.S., Hauser S.L, Purpura D.P, DeLong G.R, Swisher C.N. 1980. Autism and mental retardationNeuropathologic studies performed in four retarded persons with autistic features. *Arch Neurol, 37: 749-753*.
- Wisniewski K.E., Segan S.M., Miezejeski C.M., Sersen E.A., Rudelli R.D. 1991. The Fra(X) Syndrome: Neurological, Electrophysiological, and Neuropathological Abnormalities. *American Journal of Medical Genetics*, 38: 476-480.
- Witter, M. 2012. Hippocampus. In C. Watson, *The mouse nervous system*. S. 112-139. Elsevier.
- Wood A.C., Friedmann C.J., Steisel I.M. 1967. Psychological factors in phenylketonuria. *Am J Orthopsychiatry*, 37: 671-679.
- Yuste R. & Bonhoeffer T. 2001. Morphologic changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci, 24:* 1071-1089.
- Zagreda L., Goodman J., Druin D.P., McDonald D., Diamond A. 1999. Cognitive deficits in a genetic mouse model of the most common biochemical cause of human mental retardation. *J. Neurosci, 19, (14)*: 6175-6182.
- Zilles K. & Rehkämper G. 1998. Funktionelle Neuroanatomie 3. Auflage. S. 302-309. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

11 Danksagung

Primär möchte ich meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Gabriele Rune, für die Vergabe dieser Arbeit, der Formulierung des Themas und der Möglichkeit in ihrem Institut mit zu arbeiten, danken. Außerdem möchte ich mich für die stetige konstruktive Zusammenarbeit, welche mich auf dem Weg zum Gelingen dieser Arbeit begleitet hat, bedanken.

Meiner Betreuerin, Frau Dr. Katja Horling, möchte ich besonders danken, da sie mich innerhalb meiner Doktorarbeit, insbesondere während der praktischen Laborarbeit und der Auswertung der Daten, geduldig begleitet hat und immerzu Zeit zur Beantwortung meiner Fragen hatte.

Ganz besonderer Dank auch an Frau Asmus und Frau Schäfer, die mir mit Ruhe und Verständnis die Methodik, welche ich für meine Doktorarbeit benötigt habe, erklärten und lehrten.

Ein Weiterer Dank gilt dem ganzen Institut, speziell meiner PKU-Forschungsgruppe. Ich habe mich durch die positive Stimmung immer sehr wohl gefühlt und werde besonders die Zeit meiner praktischen Arbeit in sehr guter Erinnerung behalten.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Freundin, Frau Annika Rüder, bedanken, die mich bei der Formatierung dieser Arbeit und auftretenden Office Problemen unterstützt hat.

Der letzte Dank gilt meiner Familie, der diese Arbeit gewidmet sei. Sie hatten jederzeit ein offenes Ohr für meine Probleme und haben mich stets unterstützt. Besonders meine Mutter hat mich immer motiviert und mir insbesondere beim Korrekturlesen allzeit zur Seite gestanden.

12 Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

13 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.