

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuroanatomie

Prof. Gabriele M. Rune

## **A culture model for the assessment of phenylalanine neurotoxicity in phenylketonuria**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Julian Fritz Friedrich Kylies  
aus Hamburg

Hamburg 2023

Die Ergebnisse dieser Studie wurden in der Zeitschrift *In Vitro Models*, Springer Verlag veröffentlicht  
("Kyliès, J., Brunne, B. & Rune, G.M. A culture model for the assessment of phenylalanine  
neurotoxicity in phenylketonuria. *In vitro models* **1**, 103–114 (2022)").

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.03.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Tim Magnus**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Gabriele Rune**

# Inhaltsverzeichnis

1. Originalversion: A culture model for the assessment of phenylalanine neurotoxicity in phenylketonuria.....	4-15
2. Weiterführende Darstellung: A culture model for the assessment of phenylalanine neurotoxicity in phenylketonuria.....	16-30
2.1 Abstract .....	16
2.2 Einleitung.....	17-21
2.2.1 Phenylketonurie .....	17
2.2.2 Pathophysiologische Aspekte der Phenylketonurie.....	17-20
2.2.2.1 In vitro Modelle .....	17-19
2.2.2.2 In vivo Modelle .....	19-20
2.2.3 Hippokampale Schnittkulturen in einem optimierten Kulturmedium .....	20-21
2.3 Material und Methoden.....	21-25
2.3.1 Versuchstiere .....	21
2.3.2 Organotypische hippokampale Schnittkulturen.....	21
2.3.3 Experimentelles Design .....	21-22
2.3.4 Capillary Western Blot Analyse.....	22-23
2.3.5 Immunfluoreszenz.....	23-24
2.3.6 Bilderfassung .....	24
2.3.7 Mikroglia-Analyse - Intensität, Fläche-Volumen-Quotient, Mikroglia-Dichte.....	24-25
2.3.8 Synaptophysin-, SNAP25- und PSD95-Bildanalyse .....	25
2.3.9 Statistische Analyse.....	25
2.4 Ergebnisse und Diskussion .....	25-27
2.5 Ethische Genehmigung .....	28
2.6 Interessenkonflikt.....	28
2.7 Literaturverzeichnis .....	28-30
3. Zusammenfassung.....	31
4. Erklärung des Eigenanteils .....	32
5. Danksagung .....	32
6. Lebenslauf.....	33
7. Eidesstattliche Versicherung.....	34



# A culture model for the assessment of phenylalanine neurotoxicity in phenylketonuria

Julian Kyllies<sup>1</sup> · Bianka Brunne<sup>1</sup> · Gabriele M. Rune<sup>2</sup>

Received: 9 July 2021 / Revised: 9 November 2021 / Accepted: 16 November 2021 / Published online: 27 January 2022  
© The Author(s) 2021

## Abstract

**Objective** Phenylketonuria (PKU) is caused by a specific mutation of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene. The deficiency of PAH results in high phenylalanine levels (Phe), low tyrosine levels (Tyr), and reduced catecholamine neurotransmitters. The majority of PKU patients, if untreated, develop severe mental retardation. The specific contribution of high Phe and low Tyr levels in mental retardation is largely unknown. In this study, we used organic hippocampal slice cultures in an optimized medium as an adequate culture model to decipher the precise role of high Phe and low Tyr levels on synaptic and glial integrity in PKU. The hippocampus is closely related to learning and memory and reduced catecholamine neurotransmitter levels can be neglected since these neurotransmitters do not derive from the hippocampus. Cultures exposed to physiological concentrations of Phe were compared with cultures exposed to doses of Phe/Tyr, as in the cerebral fluid of PKU patients.

**Methods** Using capillary western blot analysis and immunohistochemistry, followed by quantitative image analysis, we tested the expression of various pre- and postsynaptic proteins (PSD95, synaptopodin, SNAP25, synaptophysin), glial cell markers (GFAP, Iba1, P2Y12, CD68, C3b), and the morphology of glial cells.

**Results** We found a downregulation of the postsynaptic protein PSD95 and the presynaptic protein SNAP25 in the presence of high/low Phe/Tyr levels after 3 weeks, which, then however, recovered after 6 weeks in culture. Furthermore, no change in the expression pattern of glial proteins was observed.

**Conclusion** Our results show that high Phe levels/low Tyr levels alone are unlikely to substantially contribute to mental retardation in PKU. The direct neurotoxic potency of high Phe/low Tyr concentrations is almost negligible since the effects are transient. The transient character in the presence of unchanged levels of high Phe/low Tyr points to a role of reduced catecholamine derivate neurotransmitters, rather than of high Phe/low Tyr levels in PKU.

**Keywords** Organotypic slice cultures · Hippocampus · PKU-adopted culture medium · Microglia · Synaptic proteins

## Introduction

Phenylketonuria is an autosomal recessive inborn error of L-phenylalanine (Phe) metabolism (for review, see [1]). In phenylketonuria (PKU), mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene decrease the ability of PAH to convert Phe to tyrosine (Tyr). This conversion takes place

in the liver, the only organ with PAH expression. Consequently, PAH deficiency results in increased Phe levels and decreased Tyr levels in the blood and brain. The decrease in Tyr levels, in particular, is even worse in the brain, as Phe and Tyr use the same L-type amino acid transporter (LAT1), which has a high affinity for Phe [2]. As a consequence, low Tyr levels are followed by reduced neurotransmitter biosynthesis, such as serotonin and dopamine. Clinically, patients, if untreated, develop severe intellectual disability, epilepsy, and behavioral and psychiatric problems. A worldwide neonatal screening has been successfully established to diagnose and identify carriers of PKU. Treatment of PKU is centered on dietary modifications to include a specifically manufactured diet that is low in protein and Phe free (for review, see [3, 4]).

✉ Gabriele M. Rune  
gabriele.rune@charite.de

<sup>1</sup> Institute of Neuroanatomy, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>2</sup> Institute of Cell Biology and Neurobiology, Charité Anatomy, Charité Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1 (intern: Virchowweg 6 CCO), 10117 Berlin, Germany

Despite extensive biochemical characterization of the PKU disease and positive correlation between hyperphenylalaninemia and altered neurological, behavioral, and cognitive deficits, the pathophysiology of disability remains poorly understood. It has been suggested that competitive transport inhibition of neutral amino acids by high Phe levels at the blood brain barrier could inhibit protein synthesis in the brain [5] [6]. In addition, Phe as an essential amino acid is crucial for the synthesis of Tyr and its catecholamine derivative neurotransmitter such as dopamine, norepinephrine and epinephrine, and serotonin. PKU patients show reduced levels of these neurotransmitters [7]. Aside from the gray matter effects, neuropathology characterized by brain white matter abnormalities is often observed in PKU patients. There is a positive correlation between the severity of white matter alteration and the degree and duration of hyperphenylalaninemia [8]. With respect to intellectual disabilities of PKU patients, many studies have demonstrated neurotoxic properties of high levels of Phe in neuronal cultures, such as impaired survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in response to elevated Phe levels [9]. Malformation of dendritic trees with reduced lengths of neurites [10] was described, together with reduced synaptic density in the neocortex after exposure to high levels of Phe [11, 12]. It was shown that cytoskeleton proteins in the cortex are affected by Phe [12, 13]. Direct effects of increased Phe concentrations were demonstrated on glutamatergic signaling, specifically competition of L-phenylalanine with L-glycine at the glycine binding site of NMDA receptors and with L-glutamate at the glutamate binding site of AMPA receptors. Glutamatergic neurotransmission plays a key role in synaptic function, and the changes in neurotransmission may at least, in part, explain the pathophysiology associated with late or insufficiently treated PKU patients [14–17]. In all of these studies, primary dissociated cultures of cortex and hippocampus were used and the doses of Phe did not mirror the situation in PKU.

In recent years, PKU mouse models were increasingly used to assess PKU-related neurological effects [16, 18–23] [24] and they confirm, at least in part, previous findings from in vitro experiments and experiments in mice after treatment with Phe, by showing reductions in the number of axons, dendrites, and synapses and for the first time an imbalance of excitation/inhibition [25]. But there are also inconsistencies: for example, in the *Pah<sup>enu2</sup>* mouse, synaptic pruning is delayed shortly after birth, resulting in an increase in synaptic density up to 12 weeks of age [16], while Phe treatment of postnatal hippocampal slice cultures with Phe resulted in a dramatic decrease in synapse number [12, 26]. In addition, no effect of Phe was seen on microglia in vitro [12], while microglia were affected in the *Pah<sup>enu2</sup>* mouse [16, 21].

**Table 1** Final concentrations for Phe and Tyr

	L-Phenylalanine (mM)	L-Tyrosine (mM)
Control medium	0.1	0.08
PKU medium	1	0.04

Due to the complex neuropathology in PKU patients, it would be useful to know to which degree single alterations in the cascades of Phe metabolism—high Phe levels, low Tyr levels, or altered catecholamine levels—contribute to mental retardation in PKU. Thus, in order to assess the neurotoxic potency of specifically high Phe levels and low Tyr levels, we used neonatal hippocampal slice cultures and an optimized culture medium.

Firstly, the hippocampus is functionally closely related to learning and memory. The slice cultures of this part of the brain allow the study of identified neuronal types and specific synaptic connections in the hippocampus, as was described by Frotscher et al. for the first time. Later on, del Rio and Soriano established this culture model as a tool for pharmacological screening [27, 28]. In this 3D-culture model, synaptic connectivity and synaptic functionality are preserved for weeks. In general, cells cultured as 3D models show features that are closer to in vivo conditions, concerning cell morphology, gene and protein expression, and cytoarchitecture (for review, see [29]). Furthermore, the neurons are cultivated together with glia and thereby offer the opportunity to control the effects of high Phe/low Tyr levels on microglia, which were seen to be affected in the *PAH<sup>enu2</sup>* mouse [16].

Secondly, we compared slice cultures which were kept in an optimized culture medium. Phe/Tyr concentrations were supplemented in close analogy to the doses of the amino acids in PKU [26]. In previous studies, as listed above, the concentration of Phe was regularly too high, due to the fact that Phe level in commercially available culture media was ignored. Of note, commercially available neuronal culture media already contain Phe and Tyr levels high

**Table 2** Primary antibodies used in the present study

Primary antibodies	Host	Supplier catalogue no	Dilution
PSD95	Rabbit	Genetex, GTX133091	1:20
Synaptopodin	Mouse	Acris, BM5086P	1:10
SNAP25	Rabbit	Abcam, ab4/455	1:90
Synaptophysin	Rabbit	Cell Signalling, D35E4	1:25
GFAP	Rabbit	Dako, Z0334	1:250
P2Y12	Rabbit	Invitrogen, 4H5L19	1:50
CD68	Mouse	Novus Biologicals, SPM130	1:50
C3b	Mouse	SantaCruz Biotechnology, A0820	1:50

**Table 3** Primary antibody in blocking buffer for incubation

Primary antibodies	Host	Supplier catalogue no	Dilution	Secondary antibodies
PSD95	Rabbit	GeneTex, GTX133091	1:250	AlexaFluor 488 (1:500) Invitrogen A32731
Synaptophysin	Guinea pig	Synaptic Systems, 106,002	1:250	AlexaFluor 647 (1:500) Invitrogen A21450
IBA1	Guinea pig	Synaptic Systems, 234,004	1:300	AlexaFluor 488 (1:500) Invitrogen A11073
P2Y12R	Rabbit	ANASPEC, AS55043A	1:500	AlexaFluor 647 (1:500) Invitrogen A31573

above physiological levels. For example, Phe concentration is about 400  $\mu\text{M}$  in commercially available Neurobasal Medium, which would rather reflect serum levels in the range from 240 to 600  $\mu\text{M}$  (in comparison a healthy state range is from 35 to 76  $\mu\text{M}$ ) [30].

Thirdly, in many studies related to PKU and mental retardation, the accumulation of Phe in the brain was considered to account for PKU-induced cerebral dysfunction rather than decreased neurotransmitter synthesis and release [31], but as both aspects are linked to each other it is difficult to investigate their individual contribution to the overall PKU phenotype. As catecholamines (dopamine, serotonin) reach the hippocampus from other brain areas [32–34], effects due to reduced levels of catecholamines are neglectable when using organotypic slice cultures from the hippocampus. This situation provides the opportunity to investigate the effects of high Phe and low Tyr decoupled from differences in neurotransmitter levels.

In contrast to previous studies, we found, if any, only a very mild effect on synaptic protein expression after 3 weeks. Most importantly, this effect was restored in the presence of unchanged doses of Phe/Tyr after 6 weeks of treatment. This finding strongly argues against a relevant neurotoxic effect of high Phe/low Tyr in PKU, which is a life-long disease. Synapse loss and reduced length of dendrites and axons [1] in dissociated cultures very likely result from Phe doses even far above the already high Phe levels

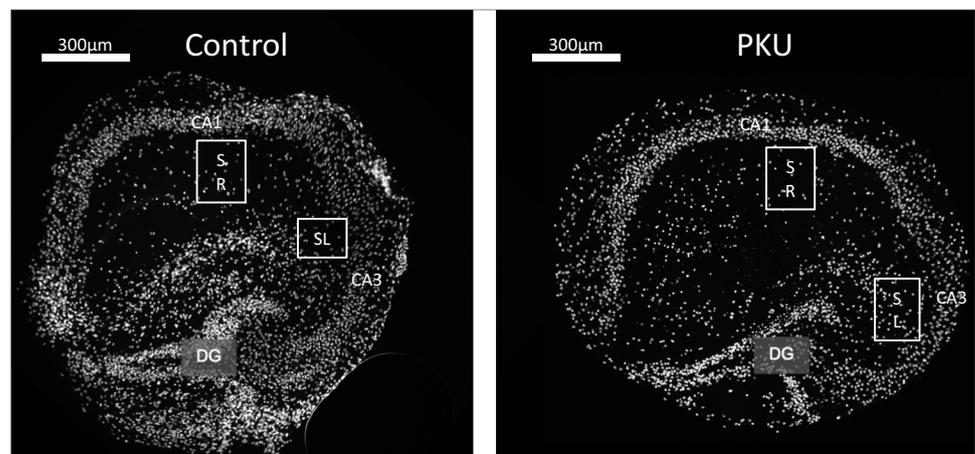
in PKU. Similarly, no effects were found on glial protein expression. Thus, the effects on glia cells, as shown in the PAH<sup>enu2</sup> mouse, do not appear to result from high Phe/low Tyr concentrations. Overall, using a cell culture system which really reflects PKU levels of Phe and Tyr reveals rather low impact on neurons and glial cells as compared to previous studies. This underlines the importance of carefully adapting cell culture conditions and sheds new light on the stand-alone impact of high Phe/low Tyr levels to the overall neurological phenotype of PKU.

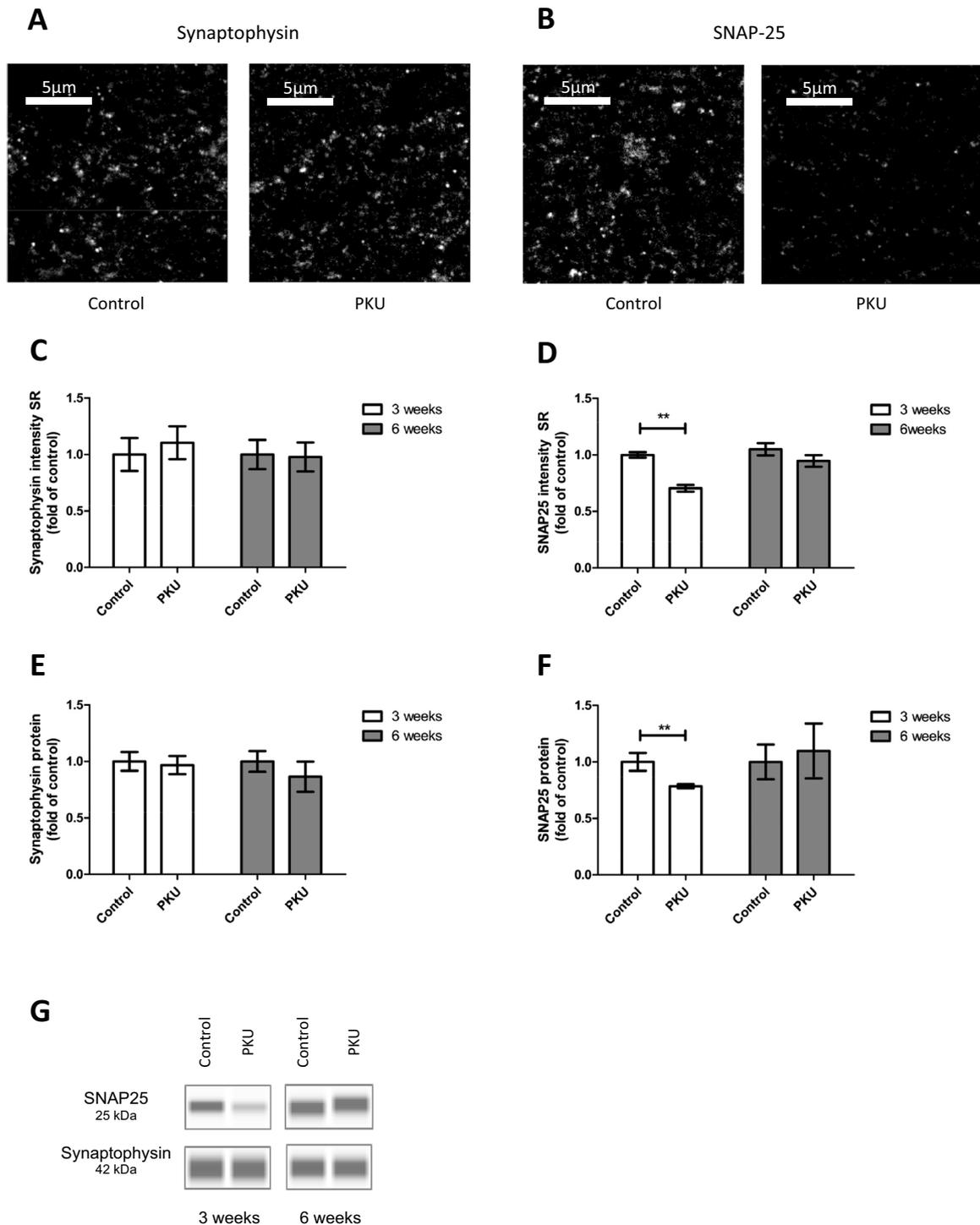
## Material and methods

### Animals

For the present study, postnatal (P4–5) male and female C57BL/6/J mice were bred in accordance with the animal care guidelines of the University of Hamburg. All animal procedures were carried out in accordance with the German law on the use of laboratory animals (German Animal Welfare Act; project number ORG 996 by the “Amt für Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen”) and were performed at the University Medical Center Hamburg Eppendorf, Dept. of Neuroanatomy.

**Fig. 1** Example figures of hippocampal slice cultures showing typical layer arrangement in both control and PKU groups. No change in the structural integrity of the tissue was seen. For synapse analysis, pictures were taken from stratum radiatum (SR) CA1 and stratum lucidum (SL) CA3 hippocampal region. For microglia analysis, pictures were taken from the stratum radiatum (SR) CA1 (DG, dentate gyrus)





**Fig. 2** Immunoreactivity of presynaptic proteins in hippocampal slice cultures treated with PKU medium compared to control condition. Example figures of synaptophysin (**A**) and SNAP-25 (**B**) in the stratum radiatum (SR) CA1 hippocampal region of slices cultured for 3 weeks. **C** Quantitative evaluation of immunohistochemical staining of synaptophysin in stratum radiatum CA1 of slices cultured for 3 and 6 weeks. At both time points, there is no change in protein expression. **D** Quantitative evaluation of immunohistochemical staining of SNAP-25 in stratum radiatum CA1 of slices cultured for 3 and 6 weeks. In cultures exposed

to PKU medium for 3 weeks, the protein is significantly downregulated. In slices cultured with PKU medium for 6 weeks, there is no change in protein expression. **E** and **F** Quantification of protein expression by capillary western blot analysis revealed no difference between synaptophysin in control cultures and cultures treated with PKU medium, but revealed a significant downregulation of SNAP-25 in cultures treated with PKU medium for 3 weeks. **G** Representative capillary western blots of synaptophysin and SNAP-25 (mean  $\pm$  SEM,  $N=10$  animals,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ , Mann–Whitney  $U$ -test or Student’s  $t$ -test)

## Organotypic hippocampal slice cultures

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared as previously described [35, 36], with some modifications. Briefly, C57BL6/J male and female littermates (postnatal days 4–5) were decapitated and both hippocampi were dissected and sliced perpendicular to their longitudinal axis (400  $\mu\text{m}$ ) using the McIlwain Tissue Chopper Standard (H. Saur Laborbedarf, Germany). Adjacent slices (sister slices) (2–3 doubles per hippocampus) were separated and single slices of each double were then transferred to separate membrane inserts (Millicell CM, 0.4- $\mu\text{m}$  culture plate inserts, 30-mm diameter; Merck Millipore) and subjected to different experimental conditions (i.e., one slice of each sister slice served as a control, whereas the corresponding slice was subjected to experimental treatment). Organotypic slices were cultivated in 6-well plates containing 1.2 ml culture medium. Slices were maintained at 37 °C in a humidified, CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere for 21 days in vitro (21DIV), or 42 days in vitro (42DIV). The cell culture medium was changed every second day.

## Experimental design

Slices from hippocampi of one pup were equally distributed onto three inserts intended for the different experimental conditions (control group: physiological Phe/Tyr levels, PKU group: high Phe/lowTyr levels). To mimic a normal and high Phe microenvironment, different concentrations of Phe and Tyr were added to custom-made L-glutamine (Glu)-, L-phenylalanine (Phe)-, phenol red-, and L-tyrosine (Tyr)-free Neurobasal™ Medium supplemented with 2% B27, 2 mM GlutaMAX, and 1% PenStrep (ThermoFisher Scientific). Final concentrations for Phe and Tyr are given in Table 1.

## Capillary western blot analysis

Organotypic hippocampal slice cultures (4–5 slices per sample) were homogenized in 60  $\mu\text{l}$  RIPA buffer consisting of 150 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40 (Sigma, Igepal, CA), 0.1% SDS (sodium dodecyl sulphate), 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, and pH 7.5, supplemented with a phosphatase and protease inhibitor cocktail (PhosSTOP and Complete EDTA-free Roche, Germany). Samples were homogenized using a tissue homogenizer (Precellys® 24 homogenizer, Bertin Technologies) for 2 min at 5000 rpm. After incubation on ice for 30 min, the lysates were centrifuged 20 min at 13,000 rpm at 4 °C. Supernatants were stored at –80 °C until further use.

Protein concentrations were determined using the BioRad Protein Assay according to the manufacturer's protocol. Capillary western blot analysis was performed using

the Protein Simple Jess system (Protein Simple, San Jose, California, USA) and the 12–230 kDa Separation Module (ProteinSimple, SM-W001) according to the manufacturer's instructions. Briefly, samples were diluted in 0.1  $\times$  sample buffer, combined with 5  $\times$  Fluorescent Master Mix, and denatured at 95 °C for 5 min. Finally, samples, blocking buffer, primary antibodies, HRP/NIR-conjugated secondary antibodies (Table 2), and chemiluminescent substrate were pipetted into the separation plate (pre-filled with Separation Matrix 2, Stacking Matrix 2, Split Running Buffer 2, and Matrix Removal Buffer). For detection, either the Anti-Rabbit (ProteinSimple, 042–206) or the Anti-Mouse Detection Module (ProteinSimple, 042–205), depending on the primary antibody, was used. Protein normalization was performed using the Protein Normalization Assay Module (Protein simple, AM-PN01). The resulting electropherograms were inspected to check whether automatic peak detection required any manual correction. Peak area calculations were performed by the Compass for Simple Western software (version 6.0) using the default Gaussian method.

## Immunofluorescence

Slices were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (in phosphate-buffered saline (PBS)) for 1 h at room temperature (RT) and cryoprotected in 25% sucrose (in PBS) overnight at 4 °C. Slices were covered with embedding medium (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound; Sakura) and frozen on dry ice. Cryosections (14  $\mu\text{m}$ ) were mounted on glass slides, dried for 1 h at RT, and stored at –20 °C until further use.

Tissue sections were thawed and air-dried for 1 h at RT. After washing with PBS containing 0.3% Triton (PBS-T), heat unmasking was performed using citrate buffer (pH 6). Unspecific binding sites were blocked with blocking buffer (2% normal horse serum, 1% BSA, 0.1 TritonX-100, and 0.05% Tween 20) for 1 h at RT. Incubation with the primary antibody was carried out in blocking buffer, overnight at 4 °C (Table 3). As secondary antibodies, Alexafluor 488 or 647 conjugated antibodies were used (1:500; Thermo Fisher Scientific, Germany), and applied for 2 h at RT. Cell nuclei were counterstained with DAPI (1:5000 Sigma-Aldrich). Sections were covered in fluorescence mounting medium (Dako, Germany).

## Image acquisition

Image acquisition of the sections was performed using the Axio Observer Z1 microscope, with ApoTome.2 module (Zeiss GmbH, Jena, Germany). Images were taken as Z-Stacks from the stratum radiatum of the CA1 and the stratum lucidum of the CA3 hippocampal region. Z-step was set to 0.2  $\mu\text{m}$  for synapse analysis and 1  $\mu\text{m}$  for microglia analysis.

For microglia analysis, a LCI Plan-Neofluar 25×/0.8 Imm Korr DIC M27 objective was used with oil immersion; for synapse analysis a Plan-Apochromat 40×/1.4 Oil DIC M27 objective was used.

### Microglia analysis—intensity, area-volume relationship, and density

To evaluate microglia activation, the staining intensity of Iba1 and P2Y12, as well as the area-volume relationship for every microglia, was measured in the stratum radiatum (CA1) using IMARIS software (Oxford Instruments, Ver. 9.7.2). Staining intensities of Iba1- and P2Y12- were measured as median intensities in every cell.

Area and volume reconstruction was carried out using both Iba1 and P2Y12 as reconstruction markers. The following parameters were used for Iba1 reconstruction: surface detail: 0.363  $\mu\text{m}$ , absolute intensity: 469, exclusion of objects being less than 8327 voxels in size. The following parameters were used for P2Y12 reconstruction: surface detail: 0.363  $\mu\text{m}$ , absolute intensity: 839, exclusion of objects being less than 7991 voxels in size. Only Iba1 and P2Y12 positive objects which contained a DAPI-stained nucleus were included in the data analysis, to exclude the possibility of measuring microglia fragments, rather than whole microglia cells. Microglia density analysis was carried out in the stratum radiatum (CA1) hippocampal region using FIJI software [37]. The region of interest was outlined in ImageJ using the polygon tool, and the area was measured. The paintbrush tool was used to mark each microglial cell to prevent double counting. Microglia were identified using the microglial cell markers Iba1 and P2Y12. Cells expressing both Iba1 and P2Y12 were labelled as double positive; cells expressing only Iba1 or P2Y12 were named Iba1 or P2Y12 single positive. Only microglia that had a DAPI-stained nucleus were used for analysis. Microglial density was calculated at the number of microglia/volume in  $\mu\text{m}^3$ . Data were collected by a single, trained researcher blind to conditions.

### Synaptophysin, SNAP25, and PSD95 image analysis

An image field of a defined size (16  $\mu\text{m} \times 16 \mu\text{m}$ ) was placed on the stratum radiatum of CA1 and the stratum lucidum of the CA3 region for synaptic protein analysis using the ROI (region of interest) tool, and staining intensities of synaptophysin, SNAP25, and PSD95 were measured using FIJI software (NCBI) [37].

### Statistical analysis

Parametric statistics were applied with simple western data ( $N = 10$  animals for each time point) that met the Shapiro–Wilk criteria for normal distribution. Immunofluorescence data ( $N = 6$  animals for each time-point) were analyzed by the non-parametric Mann–Whitney *U*-test. Statistical analysis was executed using IBM SPSS Statistics 22, and plots were prepared with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Separated bar graphs showing mean with standard error (SEM) were used to graphically depict data. Differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ .

### Results and discussion

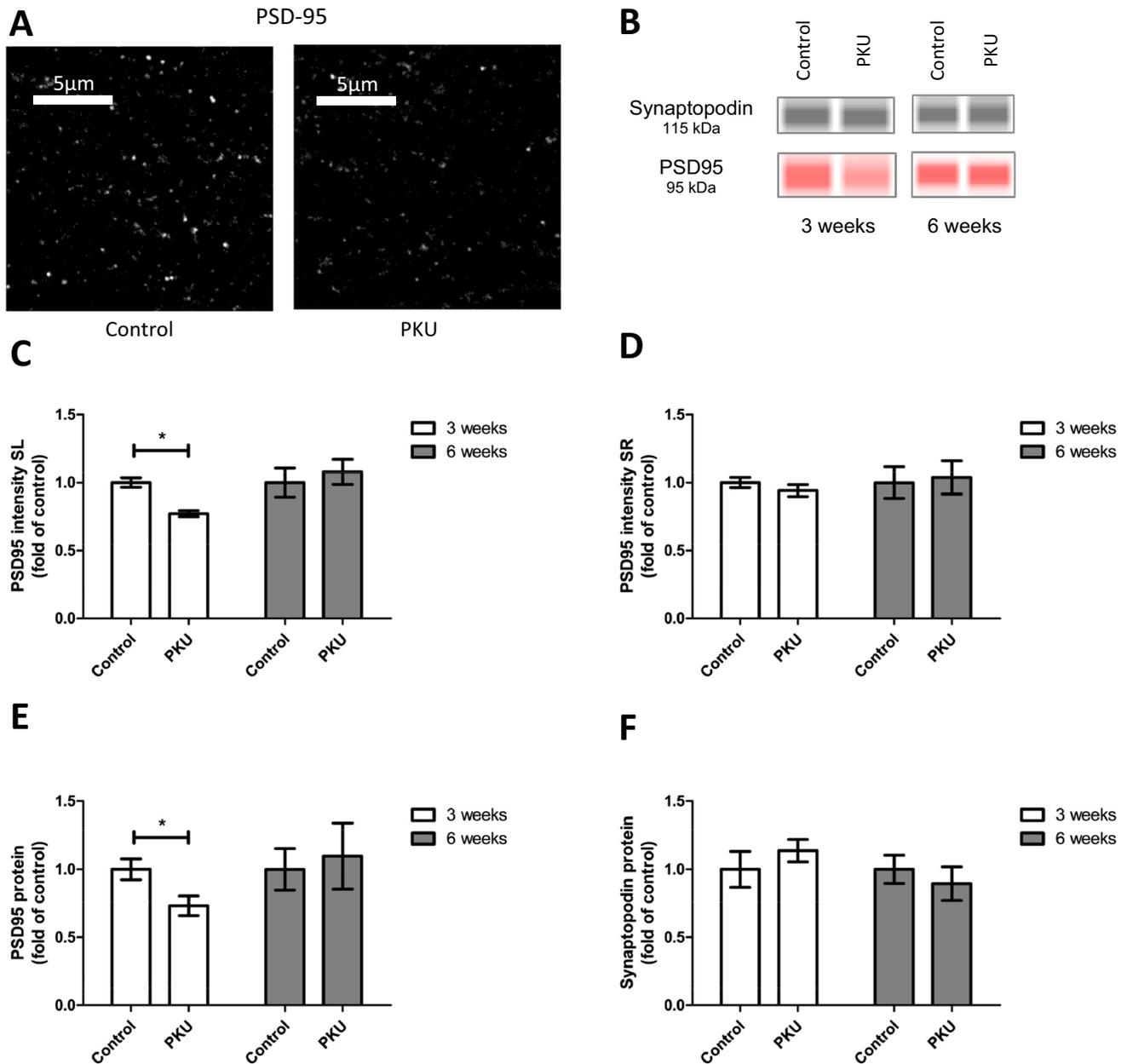
We had previously observed discrepant results regarding synaptic connectivity and glial protein expression in dissociated hippocampal neurons [12] in response to high levels of Phe and in the  $\text{Pah}^{\text{enu}2}$  mouse, the PKU mouse model [16], regarding synaptic connectivity and glial protein expression. In view of these discrepancies, we modified our experimental setup to mimic the PKU situation more closely. We used hippocampal slice cultures instead of dissociated neurons, which contain all types of glial cells in addition to all types of neurons, to maintain the in vivo structural organization. In addition, we used a custom-made Neurobasal Medium, delivered without Phe and Tyr, enabling us to adjust the level of these amino acids to meet the normal physiological brain concentration (0.08 mM Phe and 0.08 mM Tyr), or that of  $\text{Pah}^{\text{enu}2}$  mice (1 mM Phe and 0.04 mM Tyr). This regimen closely mimics, more closely than in our previous studies, the PKU situation. In both cases, control conditions with physiological concentrations of Phe and Tyr, as well as PKU conditions with elevated Phe and reduced Tyr levels, the morphology, and the typical hippocampal layer arrangement were well preserved in the slice cultures (Fig. 1).

In these hippocampal slice cultures, under the influence of defined doses of Phe/Tyr, we evaluated the expression of the post-synaptic density protein PSD95 [38] and synaptopodin [39–41]. PSD95 serves as a marker of postsynaptic spines of all types, and synaptopodin is a marker of selectively large, mature mushroom spines, the so-called memory spines. In addition, we studied synaptophysin and the synaptosomal-associated protein SNAP25 as presynaptic markers, which are involved in transmitter release. Synaptophysin is a constituent of the transmitter membrane [42] and SNAP25 is part of the presynaptic SNARE complex [43].

SNAP 25 as a presynaptic marker was downregulated after 3 weeks, but this effect was restored after 6 weeks

(Fig. 2). A similar time-dependent regulation was found with PSD95. The protein of the post synaptic membrane (Fig. 3) was reduced after 3 weeks, but restored after 6 weeks. In the case of SNAP25, this became evident using western blot analysis and also using image analysis of immunohistochemical staining. Downregulation of PSD95 was also seen in the

western blots, and was confirmed by immunohistochemistry and subsequent image analysis, at least in the stratum lucidum of the CA3 hippocampal region (Fig. 3). Altogether, the findings confirm that, in fact, high Phe levels combined with low Tyr levels transiently and directly account for disturbing effects on synaptic connectivity and functionality.

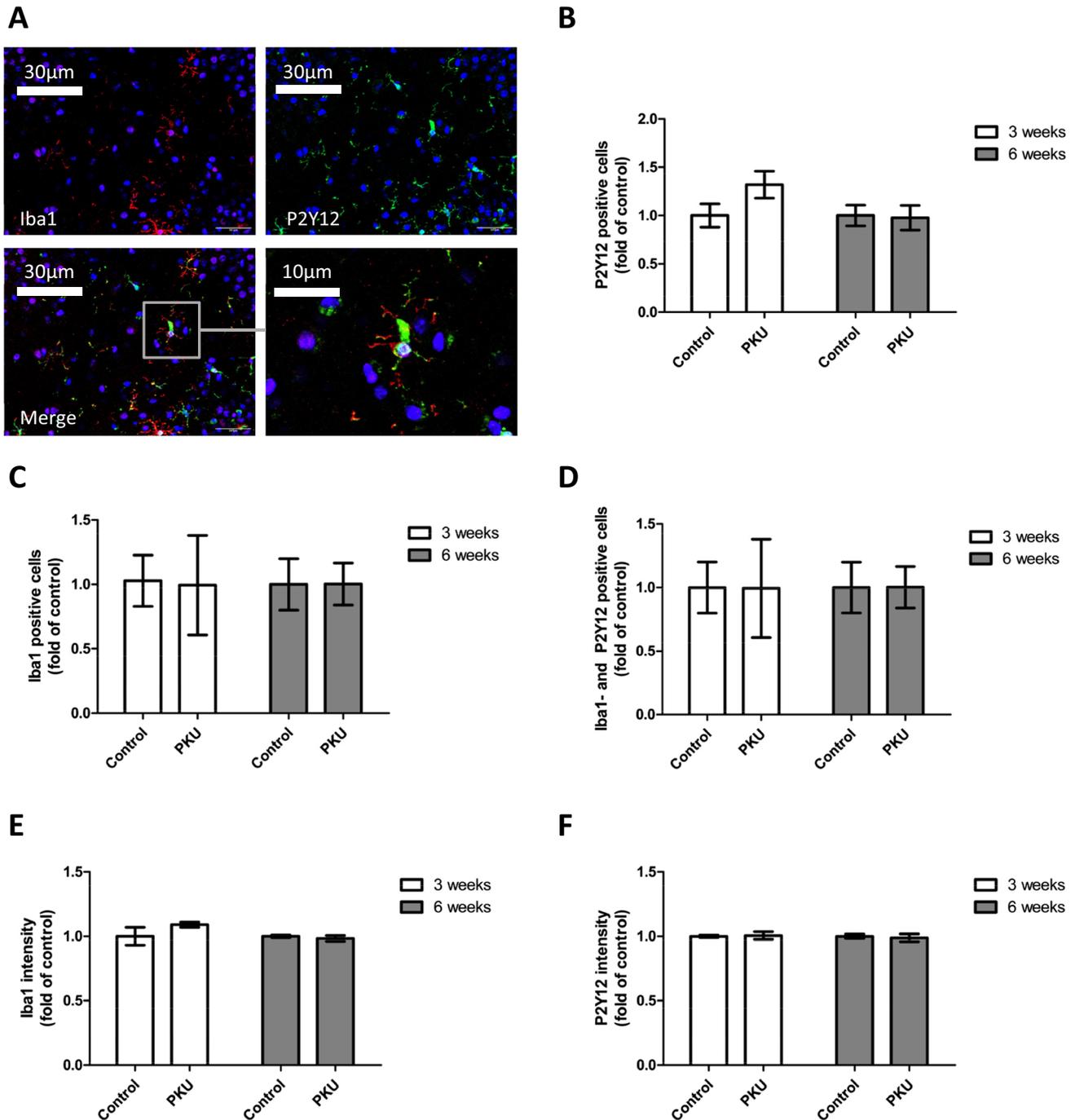


**Fig. 3** Immunoreactivity of postsynaptic proteins in hippocampal slice cultures treated with PKU medium compared to control condition. **A** Example figures of PSD-95 in the stratum lucidum (SL) CA3 hippocampal region of slices cultured for 3 weeks. **B** Representative capillary western blots of PSD-95 and synaptopodin proteins. **C** and **D** Quantitative evaluation of immunohistochemical staining of PSD-95 in stratum lucidum CA3 and stratum radiatum (SR) CA1 of slices cultured for 3 and 6 weeks. In slices cultured with PKU medium for

3 weeks, the protein is significantly downregulated in CA3, but not in CA1. In slices cultured with PKU medium for 6 weeks, there is no change in protein expression. **E** and **F** Quantification of protein expression by capillary western blot analysis revealed no difference between synaptopodin in control cultures and cultures treated with PKU medium, but revealed a significant downregulation of PSD-95 in cultures treated with PKU medium for 3 weeks (mean ± SEM,  $N = 10$  animals,  $*P < 0.05$ , Mann–Whitney  $U$ -test or Student’s  $t$ -test)

However, the effects were only seen in 3-week-old cultures, but not after 6 weeks of culture. This time dependency suggests a high vulnerability of the tissue within the first 3 weeks. It has been described that during this period of

time the slices reorganize and synaptogenesis is completed, as in vivo [27, 28]. Once synaptogenesis has come to an end, synapses become resistant against high Phe/low Tyr levels. The recovery of the neurons after 6 weeks, however,



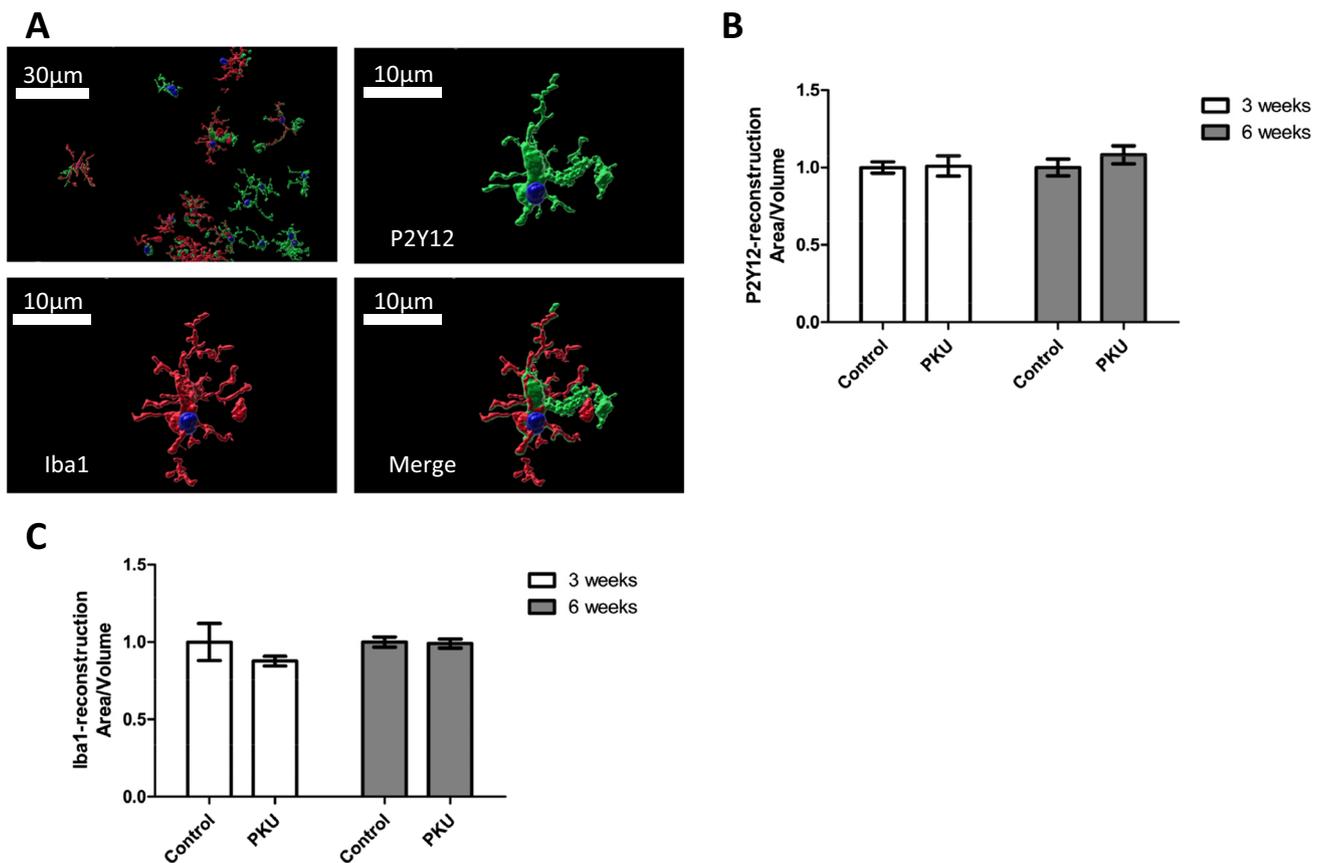
**Fig. 4** Immunoreactivity of Iba-1 and P2Y12 and microglia density in hippocampal slice cultures treated with PKU medium compared to control condition. **A** Example figures of Iba1 and P2Y12 immunoreactivity in the stratum radiatum (SR) CA1 region (PKU group), showing cell nuclei (DAPI, blue) and microglia (Iba1, red, P2Y12, green). **B–D** Quantitative evaluation of **B** P2Y12-positive, **C** Iba1-

positive, and **D** P2Y12-Iba1-double positive cells in stratum radiatum CA1 hippocampal region revealed no difference in microglia numbers of slices cultured for 3 and 6 weeks. **E** and **F** Quantitative evaluation of Iba1 and P2Y12 immunoreactivity per cell by image analysis of immunohistochemical staining using IMARIS (mean  $\pm$  SEM,  $N=6$  animals,  $*P<0.05$ , Mann–Whitney  $U$ -test)

strongly argues against primarily neurotoxic effects of high Phe/low Tyr, since PKU is a life-long disease. Above all, our findings contradict findings from earlier studies, including our own study, which showed severe neurotoxic effects in neuronal cultures, as listed in the “Introduction.” In our previous in vitro study on effects induced by high levels of Phe, we found that synapse density and dendritic length were dramatically reduced. Reduced cofilin expression and phosphorylation and reduced activation of the small GTPase Rac1 underlie these phenomena. In contrast, synapse integrity and functionality were only transiently disturbed in our modified experimental setup.

In order to assess toxic effects of high Phe/low Tyr levels on microglia, we studied the morphology of microglia present in the cultures. Activation of microglia goes along with changes in their morphology. In a quiescent state, they exhibit a ramified appearance and become circular as soon as they were activated. As commonly used markers, we used Iba1 and P2Y12 [44, 45]. No change was found in the morphology, neither in cell

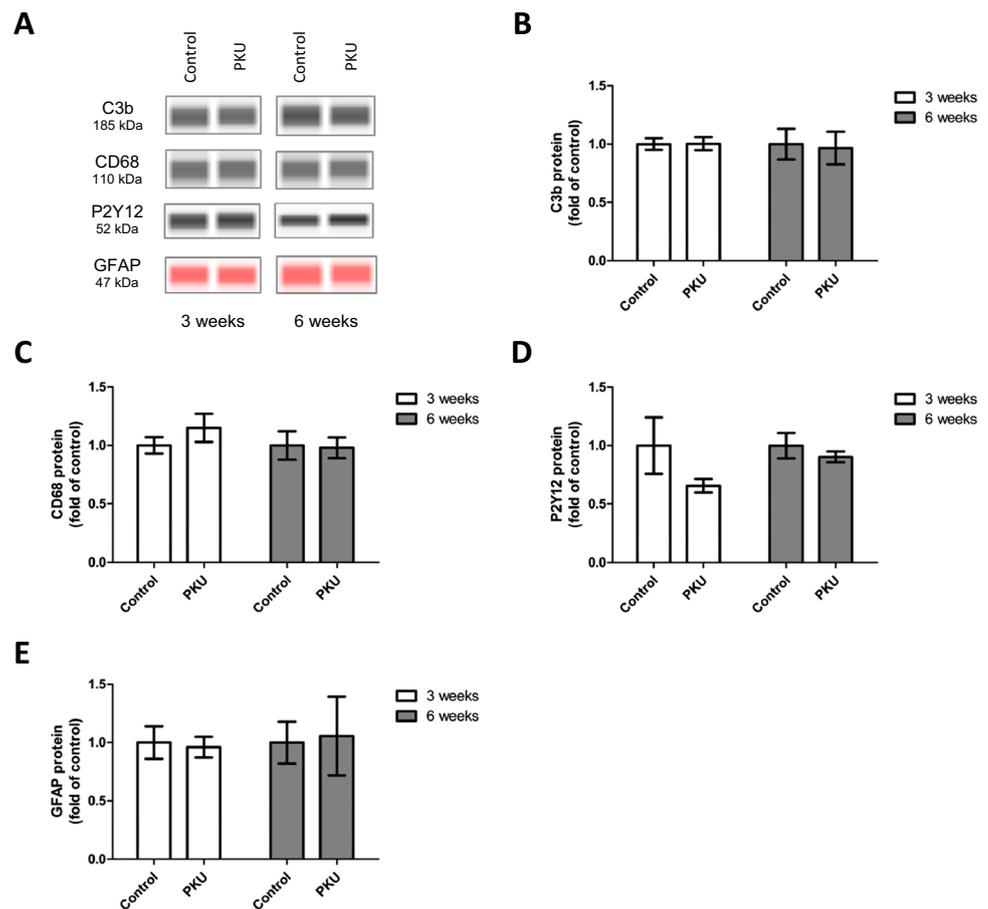
number nor in staining intensity in single cells (Figs. 4 and 5). In addition, we also studied complement C3b, which is expressed in neurons and participates in the recruitment of microglia, and CD68, a further microglia marker, and for comparative purposes P2Y12 by western blot analysis [46, 47]. No change in response to high Phe/low Tyr levels became evident (Fig. 6). Finally, we also tested GFAP, a protein specifically expressed in astrocytes, but the expression remained unchanged in our culture model (Fig. 6). Thus, the effects on glial cells that were seen in the PAH<sup>enu2</sup> [16] mouse appear to result from other factors rather than from high Phe/low Tyr levels in PKU. In the Pah<sup>enu2</sup> mouse, an established PKU mouse model, synaptic pruning after birth was delayed, resulting in increased synaptic density, despite the fact that synaptic transmission was heavily impaired on the pre- and postsynaptic sides [16]. In addition, we found decreased activity of microglia, as indicated by decreased Iba1 and C3 expression in the Pah<sup>enu2</sup> mouse, which nicely fits in with the delay in



**Fig. 5** Microglia morphology analysis in hippocampal slice cultures treated with PKU medium compared to control condition. **A** Example figures of microglia 3D-reconstruction in stratum radiatum CA1 hippocampal region (PKU group) (DAPI, blue; Iba1, red; P2Y12, green). Quantitative evaluation of microglia area-volume relationship

using **B** Iba1 and **C** P2Y12 staining as the reconstruction parameter revealed no difference between the control and PKU conditions, neither at 3 weeks nor at 6 weeks of culture (mean  $\pm$  SEM,  $N=6$  animals,  $*P < 0.05$ , Mann–Whitney  $U$ -test)

**Fig. 6** Glial cell markers in hippocampal slice cultures treated with PKU medium compared to control condition. **A** Representative capillary western blots of C3b, CD68, P2Y12, and GFAP. **B–E** Quantification of protein expression by capillary western blot analysis revealed no difference between the glial cell markers C3b, CD68, P2Y12, and GFAP in control cultures and cultures treated with PKU medium (mean  $\pm$  SEM,  $N=10$  animals,  $*P < 0.05$ , Student's  $t$ -test)



synaptic pruning, since synaptic pruning is a function of microglia activity.

Amazingly, microglia were reported to be upregulated in 5-month-old  $Pah^{enu2}$  mice [21]. This finding was based on morphological criteria, since microglia retract their branches, and the size of the cell body increases as soon as they become activated. Accordingly, the ratio of cell body to cell size increases. De Groot and coworkers [21] concluded from their data that microglia are mildly upregulated in the  $Pah^{enu2}$  mouse. Unfortunately, they did not study the complement component C3, which is one of the factors that is required for microglia recruitment and activation [47–49]. We found mRNA downregulated in the 3-month-old  $Pah^{enu2}$  mice, which is consistent with reduced Iba1 immunoreactivity. Potentially, the discrepant findings in both studies [16, 21] result from the different ages of the animals under investigation. It could very well be that the postnatally delayed synaptic pruning, in combination with reduced microglia activity, ceases as the animals become older. Nevertheless, our new data reveal that increased Phe/lowTyr levels are unlikely to account for effects on microglia in the  $Pah^{enu2}$  mouse.

As a conclusion, for the first time, our data questions a sole role of high Phe/low Tyr levels in synaptic and

glial integrity. Our in vitro model offers the opportunity to investigate the aspect of high Phe and low Tyr levels autonomously and to distinguish them from potential subsequent effects in the cascade to brain dysfunction. It appears that the processes which take place in the brain of PKU patients result from disturbances of Phe metabolism rather than from neurotoxic effects of high Phe/lowTyr levels themselves.

**Author contribution** GR: concept of the study and writing the manuscript; JK: performed the experiments and their documentation, and helped write the manuscript; BB helped with the experiments and documentation of the results.

**Funding** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

**Code availability** Not applicable.

## Declarations

**Ethics approval** All animal procedures were carried out in accordance with the German law on the use of laboratory animals (German Animal Welfare Act; project number ORG 996 by the Amt für Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen) and were performed at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Dept. of Neuroanatomy.

**Consent to participate** All the authors agree to their participation in this study.

**Consent for publication** All the authors approve the publication of the manuscript in its present form.

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- van Spronsen FJ, et al. Phenylketonuria. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;71:36.
- Pardridge WM. Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res*. 1998;235:635–44.
- Singh RH, et al. Recommendations for the nutrition management of phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med*. 2014;162:121–31.
- Porta F, Ponzzone A, Spada M. Neonatal phenylalanine wash-out in phenylketonuria. *Metab Brain Dis*. 2020;357:1225–9.
- de Groot MJ, et al. Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: review of hypotheses. *Mol Genet Metab*. 2010;99(Suppl 1):S86–9.
- Schuck PF, et al. Phenylketonuria pathophysiology: on the role of metabolic alterations. *Aging Dis*. 2015;65:390–9.
- Berguig GY, et al. Of mice and men: plasma phenylalanine reduction in PKU corrects neurotransmitter pathways in the brain. *Mol Genet Metab*. 2019;1284:422–30.
- Anderson PJ, Leuzzi V. White matter pathology in phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2010;99(Suppl 1):S3–9.
- Li D, et al. Effects of phenylalanine on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures: possible involvement of brain-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Biochem*. 2010;3391–2:1–7.
- Cordero ME, et al. Dendritic development in neocortex of infants with early postnatal life undernutrition. *Pediatr Neurol*. 1993;96:457–64.
- Horster F, et al. Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice. *Pediatr Res*. 2006;594(Pt 1):544–8.
- Schlegel G, et al. Phenylketonuria: direct and indirect effects of phenylalanine. *Exp Neurol*. 2016;281:28–36.
- de Freitas MS, et al. Effect of hyperphenylalaninemia chemically induced on in vitro incorporation of <sup>32</sup>P into cytoskeletal proteins from cerebral cortex of developing rats. *Exp Neurol*. 1997;1432:188–95.
- Glushakov AV, et al. L-Phenylalanine selectively depresses currents at glutamatergic excitatory synapses. *J Neurosci Res*. 2003;721:116–24.
- Glushakov AV, et al. Long-term changes in glutamatergic synaptic transmission in phenylketonuria. *Brain*. 2005;128(Pt 2):300–7.
- Horling K, et al. Hippocampal synaptic connectivity in phenylketonuria. *Hum Mol Genet*. 2015;244:1007–18.
- Kölker S. Metabolism of amino acid neurotransmitters: the synaptic disorder underlying inherited metabolic diseases. *J Inher Metab Dis*. 2018;416:1055–63.
- Imperlini E, et al. Altered brain protein expression profiles are associated with molecular neurological dysfunction in the PKU mouse model. *J Neurochem*. 2014;1296:1002–12.
- Bruinenberg VM, et al. A Specific nutrient combination attenuates the reduced expression of PSD-95 in the proximal dendrites of hippocampal cell body layers in a mouse model of phenylketonuria. *Nutrients*. 2016;84:185.
- Lu L, et al. AMP-activated protein kinase activation in mediating phenylalanine-induced neurotoxicity in experimental models of phenylketonuria. *J Inher Metab Dis*. 2018;414:679–87.
- van der Goot E, et al. Hippocampal microglia modifications in C57Bl/6 Pah(enu2) and BTBR Pah(enu2) phenylketonuria (PKU) mice depend on the genetic background, irrespective of disturbed sleep patterns. *Neurobiol Learn Mem*. 2019;160:139–43.
- Koppes EA, ... , Prather RS, Nicholls RD. *JCI insight*. 2020;5(20):e141523. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.141523>.
- Singh K, et al. CRISPR/Cas9 generated knockout mice lacking phenylalanine hydroxylase protein as a novel preclinical model for human phenylketonuria. *Sci Rep*. 2021;111:7254.
- Fiori E, et al. Early-onset behavioral and neurochemical deficits in the genetic mouse model of phenylketonuria. *PLoS One*. 2017;128:e0183430.
- De Jaco A, et al. Unbalance between excitation and inhibition in phenylketonuria, a genetic metabolic disease associated with autism. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5):941. <https://doi.org/10.3390/ijms18050941>.
- Joseph B, Dyer CA. Relationship between myelin production and dopamine synthesis in the PKU mouse brain. *J Neurochem*. 2003;863:615–26.
- Frotscher M, Zafirov S, Heimrich B. Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus. *Prog Neurobiol*. 1995;452:143–64.
- del Río JA, Soriano E. Regenerating cortical connections in a dish: the entorhino-hippocampal organotypic slice co-culture as tool for pharmacological screening of molecules promoting axon regeneration. *Nat Protoc*. 2010;52:217–26.
- Vinci M, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol*. 2012;101:29.
- Hoeks MP, den Heijer M, Janssen MC. Adult issues in phenylketonuria. *Neth J Med*. 2009;671:2–7.
- Sawin EA, Murali SG, Ney DM. Differential effects of low-phenylalanine protein sources on brain neurotransmitters and behavior in C57Bl/6-Pah(enu2) mice. *Mol Genet Metab*. 2014;1114:452–61.
- Awasthi JR, et al. Comprehensive topographical map of the serotonergic fibers in the male mouse brain. *J Comp Neurol*. 2021;5297:1391–429.
- Kramar CP, et al. The late consolidation of an aversive memory is promoted by VTA dopamine release in the dorsal hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2021;533:841–51.
- McNamara CG, Dupret D. Two sources of dopamine for the hippocampus. *Trends Neurosci*. 2017;407:383–4.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*. 1991;372:173–82.
- Meseke M, et al. Distal dendritic enrichment of HCN1 channels in hippocampal CA1 is promoted by estrogen, but does not require reelin. *eNeuro*. 2018;5(5). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0258-18.2018>.
- Schindelin J, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;97:676–82.

38. Meyer D, Bonhoeffer T, Scheuss V. Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. *Neuron*. 2014;822:430–43.
39. Vlachos A, et al. Synaptopodin regulates denervation-induced homeostatic synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;11020:8242–7.
40. Korkotian E, Frotscher M, Segal M. Synaptopodin regulates spine plasticity: mediation by calcium stores. *J Neurosci*. 2014;3435:11641–51.
41. Segal M. Dendritic spines: morphological building blocks of memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2017;138:3–9.
42. Gordon SL, Leube RE, Cousin MA. Synaptophysin is required for synaptobrevin retrieval during synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci*. 2011;3139:14032–6.
43. Sutton, R.S. and A.G. Barto, Reinforcement learning: an introduction (adaptive computation and machine learning). Cambridge, MA: MIT Press. 1998; 322.
44. Yu T, et al. P2Y12 regulates microglia activation and excitatory synaptic transmission in spinal lamina II neurons during neuropathic pain in rodents. *Cell Death Dis*. 2019;103:165.
45. Peng J, et al. Microglial P2Y12 receptor regulates ventral hippocampal CA1 neuronal excitability and innate fear in mice. *Mol Brain*. 2019;121:71.
46. Badimon A, et al. Negative feedback control of neuronal activity by microglia. *Nature*. 2020;5867829:417–23.
47. Schafer DP, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*. 2012;744:691–705.
48. Stephan AH, Barres BA, Stevens B. The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci*. 2012;35:369–89.
49. Stevens B, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 2007;1316:1164–78.

## 2. Weiterführende Darstellung: A culture model for the assessment of phenylalanine neurotoxicity in phenylketonuria

### 2.1. Abstract

Phenylketonurie (PKU) ist eine Stoffwechselerkrankung, die mit einer schweren geistigen Retardierung einhergeht. Durch eine Mutation des Phenylalaninhydroxylase (PAH)-Gens kommt es bei der PKU zu einer Akkumulation der Aminosäure Phenylalanin (Phe), einer Verringerung der Aminosäure Tyrosin (Tyr) sowie zu einer Störung der Katecholamin-Neurotransmitter-Synthese. Trotz der Korrelation der Hyperphenylalaninämie mit der Schwere der geistigen Retardierung bleibt der genaue pathophysiologische Zusammenhang zwischen den veränderten Phe-/Tyr-Spiegeln und dem neurologischen Phänotyp bisher unbekannt. Um den direkten Einfluss hoher Phe-/niedriger Tyr-Spiegel auf die synaptische und gliale Integrität bei der PKU zu ermitteln, etablierten wir organotypische hippokampale Schnittkulturen in einem optimierten PKU-Medium als modifiziertes PKU-*in-vitro*-Modell. Die Untersuchung des Hippokampus eignet sich hierfür ideal, da dieser in engem Zusammenhang mit Lern- und Gedächtnisprozessen steht, aber Katecholamin-Neurotransmitter nicht in diesem Teil des Gehirns produziert werden. Dies ermöglichte es uns die Einwirkung der Phe-Tyr-Dysbalance unabhängig von einer gestörten Katecholamin-Neurotransmittersynthese zu untersuchen. Schnittkulturen, die in einem Medium mit physiologischen Phe-/Tyr-Spiegeln kultiviert wurden, dienten als Kontrolle und wurden mit Kulturen in einem adaptierten PKU-Medium mit hohen Phe-/niedrigen Tyr-Spiegeln verglichen. Durch die Berücksichtigung der Phe-Konzentrationen in kommerziell erhältlichen Kulturmedien entsprach die Phe-/Tyr-Exposition in der experimentellen Gruppe in dieser PKU-*in-vitro*-Studie erstmalig den Phe-/Tyr-Spiegeln wie sie bei PKU-Patienten gefunden werden. Anhand dieses Versuchsaufbaus untersuchten wir das Expressionsverhalten verschiedener prä- und postsynaptischer Proteine (Postsynaptic Density Protein (PSD) 95, Synaptopodin, Synaptosomal Associated Protein (SNAP) 25, Synaptophysin), Gliazellmarker (Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Iba1, P2Y12, CD68, C3b) und die Gliazell-Morphologie in den Kulturen. Hierfür nutzten wir Capillary Western Blot Analysen und immunhistochemische Untersuchungen, gefolgt von quantitativen Bildanalysen. Unter dem Einfluss derangierter Phe-/Tyr-Spiegel zeigte sich nach drei Wochen *in vitro* eine transiente Herunterregulation des postsynaptischen Proteins PSD95 und des präsynaptischen Proteins SNAP25. Dieser Effekt war im weiteren Verlauf rückläufig und nach 6 Wochen Kultivierung nicht mehr vorhanden. Es wurde weder ein Effekt auf das Expressionsmuster glialer Proteine noch auf deren Morphologie festgestellt. Anhand unserer Studie konnten wir zeigen, dass veränderte Phe-/Tyr-Spiegel nahezu keinen direkten Effekt auf die synaptische und gliale Integrität bei der PKU ausüben. Insbesondere der transiente Charakter der Effekte hoher Phe-/niedriger Tyr-Spiegel lässt schlussfolgern, dass eher eine reduzierte Synthese von Katecholamin-Neurotransmittern die Ursache der geistigen Retardierung im Rahmen der PKU ist.

## 2.2. Einleitung

### 2.2.1 Phenylketonurie

Die Erkrankung Phenylketonurie (PKU) wird ausgelöst durch eine angeborene Störung des Phenylalanin-Hydroxylase (PAH)-Gens [1]. Das Enzym PAH wird ausschließlich in der Leber exprimiert und katalysiert hier die Umwandlung der Aminosäure Phenylalanin (Phe) in Tyrosin (Tyr). Bei der PKU liegt ein mutiertes PAH-Gen vor, das in der Folge je nach Mutationssubtyp zu einer reduzierten PAH-Expression bzw. zu einer dysfunktionalen PAH führt. In der Folge kommt es bei der PKU zu einer verringerten Umwandlung der Aminosäure Phenylalanin (Phe) in Tyrosin (Tyr). Das Blut und der Liquor von an PKU-erkrankten Patienten zeigt daher eine Phe-Tyr-Dysbalance mit erhöhten Phe- und erniedrigten Tyr-Spiegeln. Die Auswirkungen des gestörten Phe-Tyr-Gleichgewichts auf die zerebrale Homöostase sind vielfältig. Das klinische Bild unbehandelter PKU-Patienten ist interindividuell stark unterschiedlich. In der Regel werden Kinder, die an PKU erkrankt sind, in etwa ab dem 4.-6. Lebensmonat klinisch auffällig. So zeigen sich Kinder oft mit psychomotorischen Entwicklungsrückständen, zerebralen Krampfanfällen sowie hellem Haut- und Haarkolorit. Bleibt die Erkrankung unbehandelt, führt die PKU im Erwachsenenalter zu einer schweren geistigen Retardierung und neuropsychiatrischen Auffälligkeiten [2]. Der genaue klinische Ausprägungsgrad kann stark variabel sein. In westlichen Ländern fällt die Erkrankung im weltweit etabliertem Neugeborenen-Screening mittels Phe-Bestimmung aus Fersenblut und sich anschließendem Tetrahydrobiopterin-Belastungstest bereits frühzeitig auf, sodass das Vollbild der PKU kaum noch beobachtet wird. Als einzige therapeutische Maßnahme steht die möglichst Phe-arme Diät mit einer Reduktion des Konsums von Fleisch, Geflügel, Fisch, Hülsenfrüchten etc. im Vordergrund [2, 3].

Die genauen Pathomechanismen, insbesondere der geistigen Retardierung, sind nur unzureichend bekannt, sodass bisher noch keine zufriedenstellenden Erklärungsmodelle etabliert werden konnten. Die verschiedenen pathophysiologischen Erklärungsansätze werden im Folgenden näher erläutert.

### 2.2.2 Pathophysiologische Aspekte der Phenylketonurie

#### 2.2.2.1 *In Vitro* Modelle

Die biochemische Grundlage der PKU bildet in erster Linie eine Phe-Tyr-Dysbalance. Hierbei akkumuliert Phe, während Tyr in verringertem Maße gebildet wird. Biochemische Analysen des Phe-Synthesewegs haben ergeben, dass reduzierte Tyr-Spiegel im Gehirn zu einer verringerten Biosynthese Tyr-abhängiger Neurotransmitter wie Serotonin und Dopamin führen [4]. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass die bisherigen Studien jedoch keine Korrelation zwischen einer erniedrigten Tyr-Konzentration im Blut und dem klinischen Ausprägungsgrad der PKU gezeigt haben. Unterstützend kommt hierzu, dass eine Tyr-Supplementation allein, also ohne gleichzeitige Phe-Restriktion, ebenfalls eine geistige Retardierung bei PKU-Erkrankten nicht verhindert [5]. Im Gegensatz hierzu ist die Korrelation zwischen einer Hyperphenylalaninämie im Blut und der geistigen Retardierung bei der PKU gut belegt. Erhöhte Phe-Spiegel im Blut erhöhen nachweislich das Risiko neurologische, verhaltensbezogene und kognitive Defizite zu entwickeln [5].

Unverstanden bleibt die Frage nach dem genauen kausalen Zusammenhang zwischen erhöhten Phe-Spiegel in Blut/Gehirn und einer geistigen Retardierung bei der PKU. Ein Erklärungsansatz bildet eine Phe-bedingte Reduktion in der Aufnahme sog. "large neutral amino acids (LNAAs)" über die Bluthirn-Schranke ins Gehirn gezeigt werden. Der Transport von Aminosäuren über die Blut-Hirn-Schranke wird über neun Aminosäuretransporter vermittelt. Der am besten untersuchte Aminosäuretransporter ist der Large Neutral Amino Acid Type 1 (LAT1)-Transporter. Der LAT1 ist für den selektiven Transport der LNAAs Valin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Threonin, Tryptophan, Histidin, Tyr und Phe verantwortlich [4]. Die Bindung der LNAAs und damit deren Transport über die Bluthirn-Schranke ins Gehirn verläuft als kompetitiver Prozess. So binden die verschiedenen LNAAs mit unterschiedlich hoher Affinität und in Abhängigkeit der lokalen LNAA-Konzentration an den LAT1. Gleichzeitig verläuft der Transport ins Gehirn als Austausch-Transport. Für jede ins Gehirn aufgenommene

LNAAs werden eine andere LNAAs aus dem Gehirn ins periphere Blut ausgetauscht. In einem gesunden Organismus mit physiologischer LNAAs-Homöostase ist der LAT1 fast vollständig gesättigt und weist in diesem Zustand die höchste Affinität für Phe auf. Bei PKU-Patienten, also Patienten mit stark erhöhten Phe-Spiegeln, wird der Transporter daher nahezu vollständig durch Phe abgesättigt. Dies hat zur Folge, dass nicht nur kaum noch Nicht-Phe-LNAAs anterograd ins Gehirn transportiert werden, sondern gleichzeitig im Austausch mit Phe auch vermehrt Nicht-Phe-LNAAs aus dem Gehirn retrograd ins Blut ausgeschleust werden [5]. Dies hat eine dramatische LNAAs-Dysbalance im Gehirn zur Folge. Verringerte LNAAs-Spiegel und damit auch verminderte Tyr-Spiegel führen in der Folge zu einer reduzierten hirneigenen Proteinsynthese [5, 6].

Neben einer Störung der hirneigenen Proteinsynthese konnte ebenfalls gezeigt werden, dass erhöhte Phe-/niedrige Tyr-Spiegel zu einer reduzierten Neurotransmitter-Synthese führen [7]. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsansätze. So zeigte sich, dass Zwischenprodukte in der Phe-Verstoffwechslung verschiedene Enzyme des Katecholamin-Synthesewegs inhibieren [7, 8]. So werden die LNAAs Tyr, Tryptophan (Trp) und Phe durch ihre jeweiligen Hydroxylasen hydroxyliert. Als relevante Stoffwechslungszwischenprodukte entstehen u.a. L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) und 5-Hydroxytryptophan (5-HT). Studien konnten zeigen, dass erhöhte Phe-Spiegel die Trp-/Tyr-abhängigen Hydroxylasen hemmen [8]. Phe, L-DOPA, Trp und 5-Hydroxy-Tryptophan werden von der L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) zu den Neurotransmittern Phenethylamin (PEA), Dopamin, Tryptamin bzw. Serotonin umgewandelt. Bei erhöhten Phe-Spiegeln im Gehirn wird die Synthese des PEA durch AADC gesteigert. Erhöhte PEA-Spiegel inhibieren die AADC durch einen negativen Feedback-Mechanismus. Die Synthese der übrigen Neurotransmitter, die von AADC umgesetzt werden, wird folglich in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Enzym-Affinität reduziert. Interessanterweise wird nicht nur die Synthese der o.g. Neurotransmitter durch supraphysiologisch erhöhte Phe-Spiegel gestört, sondern auch die Noradrenalin-Synthese wird durch erhöhte PEA-Spiegel eingeschränkt. Sowohl PEA als auch Dopamin werden von der Dopamin-Beta-Hydroxylase in Phenylethanolamin bzw. Noradrenalin umgewandelt. Bei einer PEA-Akkumulation kommt es in der Folge zu einer verringerten Umwandlung von Dopamin in Noradrenalin und zu einer vermehrten Umwandlung von PEA in Phenylethanolamin [8].

Wie oben aufgeführt scheinen erhöhte Phe-Spiegel dramatische biochemische Effekte auszuüben.

Neuropathologische Untersuchungen von PKU-Patienten konnten einen Zusammenhang zwischen Höhe der Phe-Spiegel und Veränderungen der weißen Hirnsubstanz zeigen [9]. Gehirne unbehandelter PKU-Patienten zeigten eine gestörte Myelinisierung und eine astrozytäre Gliose [10]. Ähnliche Ergebnisse konnten in PKU-Mausmodellen gezeigt werden. Hierbei zeigte sich eine gestörte Funktion der Oligodendrozyten als Reaktion auf erhöhte Phe-Spiegel [11]. Da Oligodendrozyten im ZNS die myelinbildenden Zellen sind, bestätigen die Ergebnisse, dass die PKU mit einer dramatischen Störung in der weißen Substanz einhergeht. Darüber hinaus wiesen Ratten, die einer Phe-reichen Ernährung ausgesetzt wurden, einen erhöhten Myelin-Abbau und eine verringerte Myelin-Synthese auf [12].

Auf Grundlage dieser Ergebnisse zeigten viele Studien direkte neurotoxische Auswirkungen hoher Phe-Konzentrationen auf neuronale Zellkulturen. Li et al. kultivierten Rattenneurone mit Phe und zeigten, dass die Phe-Behandlung zu einem reduzierten Neuritenwachstum und erhöhtem neuronalen Zelltod führte. Des Weiteren zeigte die Studie eine reduzierte Expression von Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) [13]. Weitere Studien mit ähnlichem Versuchsaufbau zeigten eine Reduktion von Neuritenlängen und Malformationen dendritischer Verknüpfungen sowie eine reduzierte synaptische Dichte im Neokortex nach Phe-Exposition [14]. Außerdem konnte ein inhibierender Effekt von Phe auf das Enzym Pyruvatkinase in Komplex V der Atmungskette demonstriert werden. Interessanterweise zeigte sich der stärkste Effekt der Phe-Behandlung insbesondere in den ersten Wochen der Kultur [14, 15]. Es konnte sogar ein Effekt hoher Phe-Spiegel auf Zytoskelett-Ebene nachgewiesen werden. In einer Studie von de Freitas et al. wurden Ratten definierte Dosen von L-Phenylalanin vom 6. bis zum 14. Tag postpartum injiziert. Die Arbeit zeigte, dass chronisch erhöhte Phe-Spiegel zu einer erhöhten Phosphorylierung der 150-kDa neurofilamentösen Untereinheit des Tubulin-Proteins des Zytoskeletts im Neokortex führte. Zusätzlich hierzu wurde ein inhibitorischer

Effekt auf die Kalzium-/Calmodulin-abhängige Protein-Kinase-II gezeigt [16]. Darüber hinaus konnte in kultivierten Maus-Neuronen unter Phe-Behandlung eine reduzierte synaptische Dichte und dendritische Länge nachgewiesen werden. Die Autoren vermuteten als Ursache für diese strukturellen Veränderungen eine verringerte Aktivität der GTPase Rac1 [17].

Neben Effekten hoher Phe-Spiegel auf morphologischer Ebene üben erhöhte Phe-Spiegel auch einen Effekt auf funktionaler Ebene aus. So konnten direkte Auswirkungen erhöhter Phe-Konzentrationen auf die glutamaterge Signalübertragung nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang scheint insbesondere die Konkurrenz von L-Phe mit L-Glycin an der Glycin-Bindungsstelle von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren und mit L-Glutamat an der Glutamat-Bindungsstelle von  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure (AMPA)-Rezeptoren von Bedeutung zu sein [18]. Die glutamaterge Neurotransmission spielt eine Schlüsselrolle bei der synaptischen Funktion. Da L-Phe die Funktion der glutamatergen AMPA-, bzw. NMDA-Rezeptoren stört, scheint dies ebenfalls ein relevanter pathophysiologischer Erklärungsansatz zu sein [18-21].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bisherigen Ergebnisse zahlreicher *in-vitro*-Studien der PKU Veränderungen unter Phe-Exposition sowohl auf struktureller als auch auf funktioneller Ebene zeigen. All diesen Studien ist gemein, dass dissoziierte Primärkulturen des Kortex, bzw. des Hippokampus genutzt wurden. Die Ergebnisse solcher Studien spiegeln nur bedingt die *in vivo*-Situation wider. Bei dissoziierten Kulturen wird das Nervengewebe zunächst in einzelne Zellen zerlegt und dieses wird dann auf zweidimensional beschichteten Glasträgern gezüchtet [22]. Problematisch ist hierbei, dass die Zellen zwar adäquat kultiviert werden können, jedoch die gesamte funktionelle Organisation der betrachteten neuronalen Verbände nicht mitbetrachtet werden kann. Darüber hinaus geht die gesamte dreidimensionale Zytoarchitektur bei der Kultivierung verloren. Diese beiden Aspekte verringern die Übertragbarkeit solcher Studien auf die Situation *in vivo* dramatisch. Vor allem aber nutzten die bisherigen PKU-*in-vitro*-Studien Phe-Spiegel als Exposition, deren Konzentration deutlich zu hoch gewählt war und die folglich nicht die tatsächliche PKU-Situation widerspiegelte.

#### **2.2.2.2 In Vivo Modelle**

Mit der Einführung des BTBR-Pah<sup>enu2</sup>-Mausmodells [23] und der Generierung vergleichbarer Mausmodelle wurden zunehmend *in-vivo*-Modelle verwendet, um sich dem pathophysiologischen Zusammenhang erhöhter Phe-Spiegel und funktionalen neurokognitiven Einschränkungen im Rahmen der PKU zu nähern [20, 24-30]. Diese Studien bestätigten jedoch nur bedingt frühere Ergebnisse aus PKU-*in-vitro*-Studien. So konnten anhand des BTBR-Pah<sup>enu2</sup>-Mausmodells funktionelle und molekulare Veränderungen im präfrontalen Kortex gezeigt werden [31]. Die Studie demonstrierte ein Ungleichgewicht in der Übertragung inhibitorischer und exzitatorischer Transmission, bei dem es zu einer vermehrten Inhibition neuronaler Impulse der PKU-Mäuse kam. Auf molekularer Ebene konnte eine vermehrte Expression der postsynaptischen Zelladhäsionsproteine Neuroligin 1 und Neuroligin 2 gezeigt werden [31]. Außerdem wiesen Studien an PKU-Mausmodellen eine Verringerung der Anzahl von Axonen, Dendriten und Synapsen nach [20, 24-30]. Trotz einiger Übereinstimmungen zwischen *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien bleiben Widersprüche, sowohl innerhalb der *in-vivo*-Experimente als auch zwischen *in-vivo*- und *in-vitro*-Arbeiten.

So zeigte sich bei Pah<sup>enu2</sup>-Maus ein verzögertes synaptisches Pruning kurz nach der Geburt [16]. Als synaptisches Pruning bezeichnet man einen Prozess, der der Elimination überschüssiger synaptischer Verbindungen im Rahmen der neuronalen Entwicklung dient. Hierbei scheinen sowohl Neuron-interne als auch gliazelluläre Mechanismen eine entscheidende Rolle zu spielen [32]. Da es beim synaptischen Pruning zu einer Elimination synaptischer Verknüpfungen kommt, konnte eine Verzögerung im synaptischen Pruning bei der Pah<sup>enu2</sup>-Maus mit einer Zunahme der synaptischen Dichte bis zum Alter von 12 Wochen in Zusammenhang gebracht werden [16]. Im Gegensatz hierzu führte die Behandlung hippokampaler Neuronenkulturen mit Phe zu einer dramatischen Abnahme der Synapsenzahl [17, 33]. Weitere Diskrepanzen zwischen *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien zeigten sich bzgl. des Aktivierungsgrads der Mikroglia. In *in-vitro*-Modellen konnte kein Effekt auf die Aktivierung der Mikroglia festgestellt werden [17]. *In vivo* jedoch und damit passend zu der Veränderung im synaptischen Pruning, zeigte sich in der Pah<sup>enu2</sup>-Maus ein veränderter

Aktivierungsgrad glialer Zellen [20, 27]. Interessanterweise zeigten jedoch auch verschiedene Studien der gleichen PKU-Mausmodelle unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Mikroglia-Aktivität. So demonstrierten Horling et al. [20] eher eine reduzierte Mikroglia-Aktivität mit reduziertem synaptischem Pruning, während De Goot et al. [27] eher eine erhöhte Mikroglia-Aktivität nachwiesen.

### 2.2.3 Hippokampale Schnittkulturen in einem optimierten Kulturmedium

Aufgrund der Komplexität der zugrundeliegenden Mechanismen der PKU und der Widersprüchlichkeit vieler PKU-Studien wäre es essenziell die Effekte der einzelnen potentiellen pathophysiologischen Aspekte getrennt zu untersuchen. In diesem Zusammenhang müsste also zunächst zwischen den direkten Effekten hoher Phe-/niedriger Tyr-Spiegel und der gestörten Katecholamin-Synthese im Rahmen der PKU unterschieden werden. Um die Effekte hoher Phe-/ niedriger Tyr-Spiegel direkt und separat von Veränderungen der Katecholamin-Synthese zu untersuchen, nutzten wir neonatale hippokampale Schnittkulturen und behandelten diese mit einem optimierten Kulturmedium.

Der Hippokampus ist eine Hirnregion, die für Lern- und Gedächtnisprozesse verantwortlich ist. Zudem hat dieser Teil des Gehirns den Vorteil, dass eine serotonerge und dopaminerge (katecholaminerge) Innervation von anderen Hirnarealen projiziert wird und nicht im Hippokampus selbst entsteht. Damit kann bei separater Betrachtung und Kultivierung des Hippokampus der Effekt durch eine gestörte Katecholamin-Synthese vernachlässigt werden. Die direkten Effekte hoher Phe-/niedriger Tyr-Spiegel können daher separat und direkt untersucht werden. Darüber hinaus ermöglichen die Schnittkulturen dieses Teils des Gehirns die Untersuchung bestimmter Nervenzelltypen und spezifischer synaptischer Verbindungen, wie von Frotscher et al. [34] erstmals beschrieben. Bei hippokampalen Schnittkulturen handelt es sich um ein drei-dimensionales Kulturmodell, bei dem die synaptische Konnektivität und die synaptische Funktionalität über Wochen erhalten bleibt. Betrachtet man zellmorphologische Aspekte, die Gen- und Proteinexpression sowie die Zytoarchitektur, so weisen drei-dimensionale Kulturmodelle mehr Ähnlichkeit zu der Situation *in-vivo* auf [35]. Des Weiteren kultivieren wir in unserem verwendeten Kulturmodell Neuronen gemeinsam mit Gliazellen. Dadurch haben wir die Möglichkeit, die Auswirkungen von hohen Phe-/niedrigen Tyr-Spiegeln auf das Aktivierungslevel der Mikroglia zu untersuchen [20, 27].

Frühere PKU-*in-vitro*-Studien kultivierten Zellen mit kommerziell erhältlichem Kulturmedium. Problematisch ist hierbei, dass die Phe-Konzentrationen im Standard Neurobasal Medium bereits ca. 400µM betragen. Allein dies liegt schon weit oberhalb der physiologischen Phe-Konzentrationen, die bei 35 und 76µM liegen [33]. Supplementiert man dann dieses Medium noch mit dem eigentlichen "Phe-Effektor" (oft 1µM, 3µM und 5µM als drei verschiedene Expositionsstärken), so spiegelt dies bereits überhaupt nicht mehr die eigentliche PKU-Situation wider. In dieser Studie nutzten wir ein Phe-/Tyr-freies Basalmedium und passten die Phe-/Tyr-Spiegel so an, dass sie den gemessenen Konzentrationen von PKU- bzw. gesunden Patienten entsprachen.

Die oben genannten Studien, die den pathophysiologischen Zusammenhang zwischen Hyperphenylalaninämie und geistiger Retardierung im Rahmen der PKU untersuchten, schlussfolgerten, dass die Akkumulation von Phe einen direkten neurotoxischen Effekt ausübt und damit ursächlich für die beobachtete zerebrale Dysfunktion ist. Ein hiermit eng verknüpfter Effekt ist eine Reduktion in der Neurotransmittersynthese und -freisetzung [36, 37]. Es ist folglich sehr schwierig zu unterscheiden, welcher dieser beiden Effekte tatsächlich die Ursache der zerebralen Dysfunktion bei der PKU ist. Mit unserem Versuchsaufbau haben wir diese Schwierigkeit adressiert. Da eine katecholaminerge Projektion in den Hippokampus aus anderen Hirnregionen projiziert [38-40], kann bei Verwendung solcher Schnittkulturen der Effekt einer potentiell eingeschränkten Katecholamin-Neurotransmitter-Synthese vernachlässigt und der direkte neurotoxische Effekt erhöhter Phe-/niedriger Tyr-Spiegel auf die neuronale Integrität untersucht werden.

Im Gegensatz zu den vorherigen Studien fanden wir im Allgemeinen nur sehr geringe Effekte unter Phe-Exposition. In unserem Versuchsaufbau zeigte sich eine transiente Herunterregulation der synaptischen Proteinexpression. Nach 3 Wochen *in vitro* war die synaptische Proteinexpression leicht eingeschränkt. Nach weiteren 3 Wochen Kultur, also

nach insgesamt 6 Wochen, zeigte sich jedoch wieder eine Normalisierung der synaptischen Proteinexpression. Bei der PKU steigt die Schwere der Klinik sowie die Schwere der molekularen Veränderungen mit der Dauer der Phe-Exposition. Die transiente Natur der beobachteten Effekte in unserem Kulturmodell spricht daher stark gegen einen primär neurotoxischen Effekt hoher Phe-Spiegel. Die dramatischen Effekte unter Phe-Exposition, die in früheren Studien gezeigt werden konnten, resultierten sehr wahrscheinlich aus einer deutlich zu hoch gewählten Phe-Exposition, die nicht der tatsächlichen PKU-Situation entsprach. Passend hierzu konnten wir in unserer Studie keine Auswirkungen auf die Expression Glia-assoziiierter Proteine feststellen. Es scheinen also nicht erhöhte Phe-/niedrige Tyr-Spiegel ursächlich für die beobachteten Effekte auf Gliazellen in der Pah<sup>enu2</sup>-Maus zu sein. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in unserem modifizierten PKU-*in-vitro*-Modell nur sehr geringe Effekte auf Neurone und Gliazellen nachweisbar sind. Unsere Studie zeigt die Wichtigkeit, die Zellkulturbedingungen sorgfältig anzupassen und eröffnet eine neue Sichtweise auf die Auswirkungen hoher Phe-/niedriger Tyr-Konzentrationen auf den gesamten neurologischen Phänotyp der PKU.

## **2.3. Material und Methoden**

### **2.3.1 Versuchstiere**

Für die Anfertigung der organotypischen hippokampalen Schnittkulturen wurden männliche und weibliche Mäuse (P4-5) der Rasse C57BL/6/J in Einklang mit den Tierschutzrichtlinien der Universität Hamburg verwendet. Alle Experimente wurden unter Einhaltung des deutschen Versuchstierschutzgesetzes (Projektnummer ORG 996 des Amtes für Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen) am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Abteilung Neuroanatomie, durchgeführt.

### **2.3.2 Organotypische hippokampale Schnittkulturen**

Die Anfertigung der organotypischen hippokampalen Schnittkulturen wurde analog zu früheren Arbeiten durchgeführt [41, 42]. Zunächst wurden männliche und weibliche Mäuse eines Wurfes (P4-5) enthauptet und die Hippokampi wurden präpariert. Mithilfe des McIlwain Tissue Chopper Standard (H. Saur Laborbedarf, Deutschland) wurden diese senkrecht ihrer Längsachse scheibenförmig geschnitten (400µm Scheibendicke). Morphologisch geeignete Scheiben wurden heraussortiert, abgetrennt und auf getrennte Membraninserts (Millicell CM, 0,4-µm-Kulturplatteneinsätze, 30-mm-Durchmesser; Merck Millipore) übertragen. Zur Sicherung der späteren Vergleichbarkeit der hippokampalen Schnitte wurden jeweils angrenzende Scheiben pro Hippokampus für die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen, bzw. Kontrollen verwendet. Die Schnitte wurden dann in 6-Well-Platten mit 1,2ml Kulturmedium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in einer befeuchteten CO<sub>2</sub>-angereicherten Atmosphäre bei 37°C. Die Scheiben verblieben je nach experimenteller Bedingung entweder 21 oder 42 Tage *in vitro*. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte jeden zweiten Tag.

### **2.3.3 Experimentelles Design**

Im Rahmen dieser Studie wurde die Auswirkung einer PKU-adaptierten Mikro-Umgebung mit einer Kontrollgruppe verglichen. Die Schnitte der PKU-Gruppe wurden mit einem Kulturmedium mit erhöhten Phe- und niedrigen Tyr-Spiegeln kultiviert, während die Kultivierung der Kontrollgruppe mit physiologischen Phe-/Tyr-Dosen erfolgte. Die genauen Endkonzentrationen von Phe und Tyr der einzelnen Gruppen können Tabelle 1 entnommen werden. Zur Herstellung der speziellen Kulturmedien wurden die Konzentrationen von Phe und Tyr zu speziell hergestelltem l-Glutamin (Glut)-, l-Phenylalanin (Phe)-, Phenolrot- und l-Tyrosin (Tyr)-freiem Neurobasal<sup>TM</sup> Medium hinzugefügt, das mit 2% B27, 2 mM GlutaMAX und 1% PenStrep (ThermoFisher Scientific) ergänzt wurde.

Tabelle 1

	<b>L-Phenylalanin (mM)</b>	<b>L-Tyrosin (mM)</b>
<b>Kontroll-Medium</b>	0.1	0.08
<b>PKU-Medium</b>	1	0.04

### 2.3.4 Capillary Western Blot Analyse

Zur Quantifizierung der Proteinexpression wurden in der vorliegenden Studie sog. Capillary Western Blot Analysen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Art des Western Blottings, die vom Grundprinzip einer konventionellen Western Blot Analyse gleicht. Als wesentlicher Unterschied ist jedoch zu nennen, dass die einzelnen Schritte eines konventionellen Western Blots (z.B. Primär-Antikörper-Konjugation, Sekundär-Antikörper-Konjugation, Blocking etc.) nicht manuell, sondern automatisiert durchgeführt werden. Die angezüchteten organotypischen hippokampalen Schnittkulturen wurden zunächst homogenisiert. Die Scheiben wurden also mithilfe von 60µl RIPA-Puffer (Tabelle 2) und dem Gewebehomogenisator (Precellys® 24 Homogenisator, Bertin Technologies) in eine lösliche Form zur Durchführung weiterer Experimente überführt. Die Homogenisierung erfolgte für 2 Minuten bei 5000 U/min. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C und 13.000 U/min. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Überstände bei -80°C gelagert.

Tabelle 2

RIPA-Puffer	150 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40 (Sigma, Igepal, CA), 0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat), 0,5% Natriumdeoxycholat, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7,5, Phosphatase- und Proteaseinhibitor-Cocktail (PhosSTOP und Complete EDTA-free Roche, Deutschland).
-------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Zur Kalibrierung des Capillary Western Blot Systems musste in der Folge die genaue Proteinkonzentration innerhalb der einzelnen homogenisierten Lösungen determiniert werden. Die Messung der Proteinkonzentrationen erfolgte mithilfe des Bio-Rad-Protein-Assays. Hierbei handelt es sich um ein kolorimetrisches Assay, das auf der Bradford-Farbbindungsmethode basiert [43].

Die Capillary Western Blot Analysen wurden mithilfe des Protein Simple Jess Systems (Protein Simple, San Jose, California, USA) und des 12-230kDa Separations-Moduls (ProteinSimple, SM-W001) durchgeführt. Zu Beginn wurden die einzelnen Proben zunächst für die spätere Messung vorbereitet. Hierfür wurden diese zunächst in 0,1 × Probenpuffer verdünnt, mit 5 × Fluoreszenz-Master-Mix kombiniert und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Anschließend wurden die einzelnen Reaktionslösungen (Proben, Blocking-Puffer, Primär-/Sekundär-Antikörper, Chemilumineszenz-Substrat) in eine Trennplatte pipettiert. Die genauen Primär-Antikörper inkl. Herstellerinformationen können Tabelle 3 entnommen werden. Die Trennplatte wurde vom Hersteller passend zum jeweiligen Gerät mitgeliefert und war vorgefüllt mit Separationsmatrix 2, Stacking Matrix 2, Split Running Buffer 2 und Matrix Removal Buffer. Für die spätere Visualisierung der einzelnen Proteine wurde je nach Primärantikörper entweder das Anti-Kaninchen- (ProteinSimple, 042-206) oder das Anti-Maus-Detektionsmodul (ProteinSimple, 042-205) verwendet. Zur besseren späteren Vergleichbarkeit der einzelnen Signalstärken zwischen den einzelnen Proben wurde eine Protein-Normalisierung durchgeführt. Diese dient dem Ausgleich etwaiger prozeduraler Fehler (z.B. inkonsistente Probenverarbeitung, ungleiche Probenbeladung). Hierfür wurde das Protein Normalization Assay Module (ProteinSimple, AM-PN01) verwendet. Die Stärke des Signals nach Antikörper-

Anfärbung wird vom System als normalverteiltes Elektropherogramm angegeben. Die Gesamt-Signalstärke ergibt sich daher als sog. "Area under the curve (AUC)". Auch wenn das System diese Peaks i.d.R. automatisch erkennt, wurde dennoch zum Ausschluss von Systemfehlern eine visuelle Inspektion der Elektropherogramme durchgeführt. Die Peakflächenberechnungen wurden mit der Software Compass for Simple Western (Version 6.0) unter Verwendung der Standard-Gauß-Methode durchgeführt.

Tabelle 3

Primärantikörper	Wirtstier	Lieferanteninformation	Verdünnung
PSD95	Kaninchen	Genetex, GTX133091	1:20
Synaptopodin	Maus	Acris, BM5086P	1:10
SNAP25	Kaninchen	Abcam, ab4/455	1:90
Synaptophysin	Kaninchen	Cell Signalling, D35E4	1:25
GFAP	Kaninchen	Dako, Z0334	1:250
P2Y12	Kaninchen	Invitrogen, 4H5L19	1:50
CD68	Maus	Novus Biologicals, SPM130	1:50
C3b	Maus	SantaCruz Biotechnology, A0820	1:50

### 2.3.5 Immunfluoreszenz

Nach Präparation der hippokampalen Schnitte wurden diese in 4% Paraformaldehyd für eine Stunde getränkt und bei Raumtemperatur fixiert. Die Kryoprotektion der Schnitte erfolgte über Nacht bei 4°C in 25%iger Saccharose in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS). Nach der Kryoprotektion wurden die Schnittkulturen mit Einbettungsmedium (Tissue Tek® O.C.T.™ Compound; Sakura) bedeckt und auf Trockeneis eingefroren. Zur Vorbereitung für spätere Experimente wurden die Kryoschnitte mit einer Dicke von ca. 14µm auf Glasobjektträger aufgebracht und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Durchführung der Immunfluoreszenz-Analysen wurden die gefrorenen Schnittkulturen zunächst aufgetaut und eine Stunde lang bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden diese mit einem PBS-0,3%-Triton-Gemisch in mehreren Schritten gewaschen. Es folgte eine Hitzedemaskierung mit Citratpuffer (pH 6). Die Hitzedemaskierung erfolgte zur Wiederherstellung von bei der Fixierung verloren gegangener Epitopen. Als nächster wesentlicher Schritt wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Hierzu wurde ein spezieller Puffer (2% normales Pferdeserum, 1% BSA, 0,1 TritonX-100 und 0,05% Tween 20) für eine Stunde auf die Objektträger gegeben. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht (Tabelle 4). Die Sekundär-Antikörper-Konjugation erfolgte zwei Stunden lang bei Raumtemperatur. Hierfür wurden mit Alexafluor 488 oder 647 konjugierte Antikörper (1:500; Thermo Fisher Scientific, Deutschland) verwendet. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (1:5000, Sigma-Aldrich).

Tabelle 4

Primärantikörper	Wirtstier	Lieferanten- information	Ver- dünnung	Sekundärantikörper
PSD95	Kaninchen	GeneTex, GTX133091	1:250	AlexaFluor 488 (1:500) Invitrogen, A32731
Synaptophysin	Meer- schwein	Synaptic Systems, 106002	1:250	AlexaFluor 647 (1:500) Invitrogen, A21450
IBA1	Meer- schwein	Synaptic Systems, 234004	1:300	AlexaFluor 488 (1:500) Invitrogen, A11073
P2Y12R	Kaninchen	ANASPEC, AS55043A	1:500	AlexaFluor 647 (1:500) Invitrogen, A31573

### 2.3.6 Bilderfassung

Die Aufnahme der Schnittbilder erfolgte mithilfe des Axio Observer Z1 Mikroskops und dem ApoTome.2 Modul (Zeiss GmbH, Jena, Deutschland). Die Bilder wurden als sog. Z-Stapel aufgenommen. Hierbei wird nicht nur ein Bild in einer Ebene erstellt, sondern das Mikroskop fährt senkrecht durch das Präparat und erstellt mit einer definierten Schichtdicke mehrere einzelne Bilder. Dies ermöglicht es, später 3D-Rekonstruktionsanalysen durchzuführen und erhöht darüber hinaus die Treffsicherwahrscheinlichkeit der einzelnen Zellen. Die Schnittbilder wurden im Stratum radiatum im Bereich CA1 und dem Stratum lucidum im Bereich CA3 des Hippokampus erstellt. Der Z-Abstand wurde für die Analyse der Synapsen auf 0,2µm und für die Analyse der Mikroglia auf 1 µm eingestellt. Für die Mikroglia-Analyse wurde ein LCI Plan-Neofluar 25 × /0,8 Imm Korr DIC M27 Objektiv in Ölimmersion verwendet, während für die Synapsen-Analyse ein Plan-Apochromat 40×/1,4 Oil DIC M27 Objektiv eingesetzt wurde.

### 2.3.7 Mikroglia-Analyse - Intensität, Fläche-Volumen-Quotient, Mikroglia-Dichte

Zur Evaluierung der Mikroglia-Aktivität wurden verschiedene Untersuchungsmethoden angewandt. Einerseits wurde die Gesamtanzahl der Mikroglia-Zellen pro Volumeneinheit determiniert und andererseits wurden als Mikroglia-Aktivitätsmarker die Färbeintensitäten von Iba1 und P2Y12 sowie das Fläche/Volumen-Verhältnis herangezogen. Als Bereiche zur Messung der einzelnen Parameter wurde das Stratum radiatum (CA1) und das Stratum lucidum (CA3) genutzt. Die Färbeintensitäten und das Fläche-Volumen-Verhältnis jeder einzelnen Mikrogliazelle wurde als Median der Intensitäten mittels der IMARIS-Software (Oxford Instruments, Ver. 9.7.2) gemessen. Zur Evaluierung des Fläche-Volumen-Verhältnisses wurden anhand der Iba1-/P2Y12-Färbungen die einzelnen Mikroglia dreidimensional rekonstruiert (verwendete Parameter für die Iba1-Rekonstruktion: Oberflächendetail: 0,363 µm, absolute Intensität: 469, Ausschluss von Objekten mit einer Größe von weniger als 8327 Voxeln; verwendete Parameter für die P2Y12-Rekonstruktion: Oberflächendetail: 0,363 µm, absolute Intensität: 839, Ausschluss von Objekten mit einer Größe von weniger als 7991 Voxeln). Zur Qualitätssicherung der Analyse wurden nur Objekte in die Analyse miteinbezogen, die einen mit DAPI angefärbten Zellkern enthielten. Die Anzahl

der Mikroglia pro Volumeneinheit (da Auswertung als Z-Stapel) wurde im Stratum radiatum (CA1) des Hippokampus ermittelt. Mithilfe der FIJI-Software [44] wurde zunächst der relevante Bereich mittels Polygonwerkzeugen umrissen und die Fläche ermittelt. Das Pinselwerkzeug wurde genutzt, um jede einzelne vollständig abgebildete Mikrogliazelle zu markieren, um Zählungsfehler zu minimieren. Mikroglia wurden je nach Färbeverhalten entweder als Iba1-einfach-positiv, P2Y12-einfach-positiv oder Iba1-P2Y12-doppelt-positiv gekennzeichnet. Auch hier wurden nur Zellen als "Mikroglia" deklariert, die einen mit DAPI angefärbten Zellkern enthielten.

### 2.3.8 Synaptophysin-, SNAP25- und PSD95-Bildanalyse

Innerhalb des Stratum radiatum (CA1) und des Stratum lucidum (CA3) wurde mithilfe des Region of Interest (ROI)-Tools ein Bildfeld der Größe  $16\mu\text{m} \times 16\mu\text{m}$  platziert. Innerhalb dieses Bildfeldes wurden die Färbeintensitäten von Synaptophysin, SNAP25 und PSD95 mit der FIJI-Software (NCBI) gemessen [44].

### 2.3.9 Statistische Analyse

Die Datenauswertung erfolgte mit IBM SPSS Statistics 22. Die Diagramme wurden mit GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) erstellt. Als erster Schritt der Datenauswertung wurde geprüft, ob die jeweiligen Datensätze normalverteilt vorlagen. Dies wurde über die Shapiro-Wilk-Kriterien definiert. Für die Simple Western-Daten (N = 10 Tiere für jeden Zeitpunkt) ergab sich eine Normalverteilung der Daten, sodass diese mittels t-Test ausgewertet wurden. Für die Daten der Immunfluoreszenz-Analysen (N = 6 Tiere für jeden Zeitpunkt) ergab sich keine Normalverteilung, sodass diese mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests ausgewertet wurden. Zur grafischen Darstellung der Daten wurden getrennte Balkendiagramme mit Mittelwert und Standardfehler (SEM) verwendet. Unterschiede wurden als signifikant bezeichnet, wenn  $p \leq 0,05$ .

## 2.4 Ergebnisse und Diskussion

Wie in der Einleitung bereits aufgeführt, zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen der PKU [17, 20]. Während im PKU-Mausmodell die synaptische Dichte zunahm, zeigte sich im korrespondierenden PKU-*in-vitro*-Modell (mit Phe-behandelte hippokampale Neuronenkulturen) eine reduzierte synaptische Dichte und eine Malformation dendritischer Verknüpfungen. Außerdem demonstrierten Studien der Pah<sup>enu2</sup>-Maus eine reduzierte Mikroglia-Aktivität und verminderte C3 Komplement-Expression. Interessanterweise zeigte sich kein Effekt auf die Mikroglia-Aktivität und C3-Expression *in vitro* [17, 20].

Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse nutzten wir ein neuartiges und modifiziertes *in-vitro*-Modell, um die tatsächliche *in-vivo*-PKU-Situation imitieren zu können. Anstelle dissoziierter Neuronen-Kulturen nutzten wir nun ein drei-dimensionales Kulturmodell hippokampaler Schnittkulturen. Dieses Modell bietet zahlreiche Vorteile gegenüber herkömmlichen Standard-Neuronenkulturen. Neben allen Arten von Neuronen enthalten Schnittkulturen des Hippokampus zusätzlich alle Arten von Glia-Zellen. Die strukturelle Organisation sowie die drei-dimensionale Zytoarchitektur bleibt daher erhalten. Zusätzlich passten wir die Kulturbedingungen an. Während in früheren Studien die bereits hohen Phe-Spiegel im konventionell erhältlichen Kulturmedium außer Acht gelassen wurden, nutzten wir ein speziell angefertigtes Phe- und Tyr-freies Neurobasalmedium. Dies ermöglichte es uns, die Konzentrationen dieser Aminosäuren den gewünschten experimentellen Bedingungen anzupassen. Diese Studie stellt daher die erste PKU-*in-vitro*-Studie dar, in der die Phe-/Tyr-Spiegel den Spiegeln von PKU-Patienten, bzw. den Spiegeln gesunder Patienten entsprechen. Als erste Qualitätskontrolle unserer Kulturen untersuchten wir diese hinsichtlich ihrer Morphologie. Sowohl in der PKU- als auch in der Kontrollgruppe blieben die Morphologie und die typische Anordnung der hippokampalen Schichten in den Schnittkulturen adäquat erhalten (Fig. 1). Dieser morphologische Aspekt diente als Grundvoraussetzung für weitere Experimente.

Zur Untersuchung der synaptischen Proteinexpression innerhalb dieser Schnittkulturen nutzten wir die postsynaptischen Proteine PSD-95 und Synaptopodin und die präsynaptischen Proteine Synaptophysin und SNAP-25. Das Expressionsmuster von PSD-95 lässt Rückschlüsse auf die Regulation postsynaptischer Spines aller Art zu [45]. Über das Expressionsverhalten von Synaptopodin kann eher eine Aussage über reife Mushroom-Spines (Gedächtnis-Spines) [46-48] getroffen werden. Auf der präsynaptischen Seite spiegeln sowohl Synaptophysin als auch SNAP-25 Prozesse der Transmitterfreisetzung wider. Während Synaptophysin Bestandteil der Transmittermembran ist [49], ist SNAP-25 Teil des präsynaptischen SNARE-Komplexes [50]. Wichtig ist zudem, dass Veränderungen im Expressionsverhalten dieser synaptischen Proteine mit Störungen der neuronalen Entwicklung [51], ähnlich der PKU, einhergehen.

In unserer Studie zeigte sich eine zeitabhängige Herunterregulation der synaptischen Proteine SNAP-25 (Fig. 2) und PSD-95 (Fig. 3). Unter dem Einfluss hoher Phe-/niedriger Tyr-Spiegel zeigte sich bei beiden Proteinen eine Herunterregulation der Expression nach 3 Wochen *in vitro*. Spannenderweise zeigte sich dieser Effekt mit zunehmender Kulturdauer als regredient, sodass nach sechs Wochen Kultur kein Effekt mehr sichtbar war (Fig. 2, Fig. 3). Bei beiden Proteinen konnte dies sowohl mittels Western Blot als auch mittels Immunfluoreszenz-Analyse nachgewiesen werden. Der von uns beobachtete transiente Effekt hoher Phe-Spiegel auf das synaptische Expressionsmuster bestätigt Ergebnisse früherer Studien. So demonstrierten Cordero et al. und Horster et al. Malformationen dendritischer Verknüpfungen mit reduzierten Neuritenlängen und eine reduzierte synaptische Dichte im Neokortex nach Phe-Exposition mit dem stärksten Effekt in den ersten Kulturwochen und Rückgang des Effektes im weiteren Verlauf [14, 15]. Die Herunterregulation der synaptischen Proteine unter hohen Phe-/niedrigen Tyr-Spiegeln lässt sich darüber hinaus in Einklang mit zahlreichen Ergebnissen früherer PKU-Studien bringen. Hohe Phe-/niedrige Tyr-Spiegel scheinen initial direkt verantwortlich für die vermuteten Auswirkungen auf Konnektivität und Funktionalität zu sein. Jedoch spricht insbesondere die beobachtete zeitabhängige Regulation der Proteinexpression eher gegen einen primär neurotoxischen Effekt des Phe. Vielmehr ist beschrieben, dass das Gewebe nach Schnittkultur-Präparation innerhalb der ersten 3 Wochen in Kultur hoch vulnerabel gegenüber äußeren Einflüssen ist. Frühere Studien demonstrierten, dass sich in dieser Zeitspanne die Schnittkulturen reorganisieren und die Synaptogenese um den 21. Tag abgeschlossen ist [34, 52]. Nach abgeschlossener Synaptogenese und dem damit verbundenen Aufbau stabiler synaptischer Verknüpfungen scheinen die Synapsen resistent gegenüber den hohen Phe-/niedrigen Tyr-Spiegeln zu werden. Bestätigt wird dies durch die Tatsache, dass im Rahmen der PKU die Symptomschwere positiv mit der Phe-Expositionszeit korreliert [5]. Es wäre also eher ein steigender Effekt mit steigender Kulturzeit zu erwarten gewesen. Eine Regeneration des Proteinexpressionsmusters spricht daher gegen erhöhte Phe-Spiegel als Ursache für die gestörten synaptischen Vorgänge bei der PKU.

In zahlreichen Studien wurden unter Phe-Behandlung schwere neurotoxische Effekte in neuronalen Kulturen gezeigt. So kultivierten Schlegel et al. dissoziierte Hippokampus-Neurone und setzten diese stark erhöhten Phe-Spiegeln aus. Es zeigte sich unter Phe-Exposition eine Reduktion der synaptischen Dichte und dendritischen Länge. Als Ursache für diesen Effekt konnte eine verringerte Aktivität der GTPase Rac1 identifiziert werden. Rac1 phosphoryliert und aktiviert Cofilin, welches maßgeblich für die Regulierung der dendritischen Verknüpfung und synaptischen Dichte verantwortlich ist [17]. Auch diese PKU-*in-vitro*-Studie wählte Phe-Expositionen (5,4mM, inkl. Phe im Kulturmedium), die deutlich die Phe-Konzentrationen im Blut und Liquor von PKU-Patienten (ca. 1mM) übersteigt. Daher sind die Ergebnisse dieser Studie nur eingeschränkt auf die *in-vivo*-Situation übertragbar. In unserem modifizierten *In-vitro*-Modell mit adäquat angepassten Phe-/Tyr-Spiegeln waren die Integrität und Funktionalität der Synapsen nur vorübergehend gestört.

In Mausmodellen der PKU konnten Veränderungen der Mikroglia-Aktivität gezeigt werden [20, 27]. Bisher unklar war, ob erhöhte Phe-/niedrige Tyr-Spiegel hierfür direkt verantwortlich waren. In unserem modifizierten PKU-*in-vitro*-Modell untersuchten wir die Morphologie der Mikroglia und das Expressionsmuster Mikroglia-assoziiierter Proteine. Mikroglia können verschiedene Aktivierungsgrade einnehmen. In einem nicht aktivierten Zustand zeigen sie ein eher verzweigtes Erscheinungsbild mit langen Ausläufern, während sie bei Aktivierung

eine eher kugelige Konfiguration einnehmen [53]. Darüber hinaus spiegelt das Expressionsmuster der Proteine Iba1, P2Y12 und CD68 ebenfalls die Aktivität der Zellen wider [53, 54]. In unserer Studie konnten wir keinen Effekt, weder auf die Morphologie, noch auf die Zellzahl noch auf die Expression glialer Proteine, feststellen. (Fig. 4-6). Neben direkten Effekten auf Mikroglia untersuchten wir ebenfalls das Rekrutierungsverhalten der Zellen. Hierfür nutzten wir die Expression der Komplementkomponente C3b. C3b ist ein von Neuronen exprimiertes Molekül, das nachweislich Mikroglia chemotaktisch rekrutiert [55-58]. Es zeigte sich keine Veränderung in der Reaktion auf hohe Phe-/niedrige Tyr-Spiegel (Fig. 6). Schließlich untersuchten wir auch GFAP, ein spezifisches Astrozyten-assoziiertes Protein. Auch hier blieb die Expression in unserem Kulturmodell unverändert (Abb. 6).

In der Pah<sup>enu2</sup>-Maus zeigte sich ein verzögertes synaptisches Pruning kurz nach der Geburt [20]. Synaptisches Pruning gilt als Mechanismus der Elimination überflüssiger synaptischer Verbindungen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Prozess sowohl von der Mikroglia- als auch von der neuronalen Aktivität abhängig ist [59]. In der Pah<sup>enu2</sup>-Maus scheinen beide Pruning-assoziierten Mechanismen stark beeinträchtigt zu sein. So demonstrierten Horling et al. eine reduzierte Mikroglia-Aktivität anhand des Expressionsverhaltens von Iba1 und C3b sowie eine erhöhte synaptische Dichte im Neokortex von Pah<sup>enu2</sup>-Mäusen. Interessanterweise zeigte sich trotz der erhöhten synaptischen Dichte eine reduzierte Long-Term-Potentiation und Paired-Pulse-Facilitation als elektrophysiologisches Korrelat einer gestörten neuronalen Übertragung [20]. In dieser Studie hingegen konnten wir demonstrieren, dass erhöhte Phe-/niedrige Tyr-Spiegel keinen direkten Effekt auf die Aktivierung und das Rekrutierungsverhalten von Mikroglia ausüben.

Im Gegensatz zu Horling et al. zeigte eine andere PKU-*in-vivo*-Studie gegenteilige Ergebnisse. In 5 Monate alten Pah<sup>enu2</sup>-Mäusen zeigte sich hier eine gesteigerte Mikroglia-Aktivität [27]. Anhand des Fläche-Volumen-Koeffizienten schlussfolgerten die Autoren der Studie, dass die Mikroglia eine eher kugelige Konfiguration und damit eine erhöhte Aktivität aufweisen mussten. Das Rekrutierungsverhalten der Mikroglia über das Expressionsmuster von C3b wurde in dieser Studie nicht untersucht. Die abweichenden Ergebnisse dieser beiden Studien [20, 27] sind möglicherweise auf das unterschiedliche Alter der Versuchstiere zurückzuführen und müssen sich nicht zwingend widersprechen. So wäre es denkbar, dass sich unmittelbar postnatal das synaptische Pruning und damit einhergehend die Mikroglia-Aktivität verzögert. Mit steigendem Alter der Tiere könnte dieser Effekt jedoch nachlassen und die Mikroglia-Aktivität wieder ansteigen. Des Weiteren muss angemerkt werden, dass die morphologische Charakterisierung der Mikroglia in *in-vivo*-Studien nur auf zwei-dimensionalen Analysen basierte. Dies ist deutlich störanfälliger als Mikroglia mittels Rekonstruktionsanalysen exakt drei-dimensional zu rekonstruieren (siehe *Material und Methoden*).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Daten zum ersten Mal eine alleinige Rolle hoher Phe-/niedriger Tyr-Spiegel auf die synaptische und gliale Dysfunktion bei der PKU hinterfragen. In unserem neuen *In-vitro*-Modell konnten die direkten Einflüsse hoher Phe- und niedriger Tyr-Spiegel losgelöst von potenziellen Folgeeffekten in der Kaskade der Hirnfunktionsstörung untersucht werden. Abschließend lässt sich sagen, dass die pathophysiologischen Aspekte im Rahmen der PKU auf Störungen des Phe-Stoffwechsels und nicht auf direkte neurotoxische Wirkungen der hohen Phe- und niedrigen Tyr-Spiegel zurückzuführen sind.

## 2.5 Ethische Genehmigung

Alle Tierversuche wurden nach dem deutschen Versuchstierschutzgesetz (Projektnummer ORG 996 des Amtes für Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Abteilung Neuroanatomie, durchgeführt.

## 2.6 Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass sie keine konkurrierenden Interessen haben.

## 2.7 Literaturverzeichnis

1. van Spronsen, F.J., et al., *Phenylketonuria*. Nat Rev Dis Primers, 2021. **7**(1): p. 36.
2. Porta, F., A. Ponzone, and M. Spada, *Neonatal phenylalanine wash-out in phenylketonuria*. Metab Brain Dis, 2020. **35**(7): p. 1225-1229.
3. Singh, R.H., et al., *Recommendations for the nutrition management of phenylalanine hydroxylase deficiency*. Genet Med, 2014. **16**(2): p. 121-31.
4. Pardridge, W.M., *Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids*. Neurochem Res, 1998. **23**(5): p. 635-44.
5. de Groot, M.J., et al., *Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: review of hypotheses*. Mol Genet Metab, 2010. **99** Suppl 1: p. S86-9.
6. Schuck, P.F., et al., *Phenylketonuria Pathophysiology: on the Role of Metabolic Alterations*. Aging Dis, 2015. **6**(5): p. 390-9.
7. Berguig, G.Y., et al., *Of mice and men: Plasma phenylalanine reduction in PKU corrects neurotransmitter pathways in the brain*. Mol Genet Metab, 2019. **128**(4): p. 422-430.
8. Renson, J., H. Weissbach, and S. Udenfriend, *Hydroxylation of tryptophan by phenylalanine hydroxylase*. J Biol Chem, 1962. **237**: p. 2261-4.
9. Anderson, P.J. and V. Leuzzi, *White matter pathology in phenylketonuria*. Mol Genet Metab, 2010. **99** Suppl 1: p. S3-9.
10. Malamud, N., *Neuropathology of phenylketonuria*. J Neuropathol Exp Neurol, 1966. **25**(2): p. 254-68.
11. Dyer, C.A., et al., *Evidence for central nervous system glial cell plasticity in phenylketonuria*. J Neuropathol Exp Neurol, 1996. **55**(7): p. 795-814.
12. Hommes, F.A., A.G. Eller, and E.H. Taylor, *Turnover of the fast components of myelin and myelin proteins in experimental hyperphenylalaninaemia. Relevance to termination of dietary treatment in human phenylketonuria*. J Inherit Metab Dis, 1982. **5**(1): p. 21-7.
13. Li, D., et al., *Effects of phenylalanine on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures: possible involvement of brain-derived neurotrophic factor*. Mol Cell Biochem, 2010. **339**(1-2): p. 1-7.
14. Cordero, M.E., et al., *Dendritic development in neocortex of infants with early postnatal life undernutrition*. Pediatr Neurol, 1993. **9**(6): p. 457-64.
15. Horster, F., et al., *Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice*. Pediatr Res, 2006. **59**(4 Pt 1): p. 544-8.
16. de Freitas, M.S., et al., *Effect of hyperphenylalaninemia chemically induced on in vitro incorporation of <sup>32</sup>P into cytoskeletal proteins from cerebral cortex of developing rats*. Exp Neurol, 1997. **143**(2): p. 188-95.
17. Schlegel, G., et al., *Phenylketonuria: Direct and indirect effects of phenylalanine*. Exp Neurol, 2016. **281**: p. 28-36.
18. Glushakov, A.V., et al., *L-phenylalanine selectively depresses currents at glutamatergic excitatory synapses*. J Neurosci Res, 2003. **72**(1): p. 116-24.
19. Glushakov, A.V., et al., *Long-term changes in glutamatergic synaptic transmission in phenylketonuria*. Brain, 2005. **128**(Pt 2): p. 300-7.
20. Horling, K., et al., *Hippocampal synaptic connectivity in phenylketonuria*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(4): p. 1007-18.

21. Kolker, S., *Metabolism of amino acid neurotransmitters: the synaptic disorder underlying inherited metabolic diseases*. J Inherit Metab Dis, 2018. **41**(6): p. 1055-1063.
22. Lancaster, M.A. and J.A. Knoblich, *Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies*. Science, 2014. **345**(6194): p. 1247125.
23. Zagreda, L., et al., *Cognitive deficits in a genetic mouse model of the most common biochemical cause of human mental retardation*. J Neurosci, 1999. **19**(14): p. 6175-82.
24. Imperlini, E., et al., *Altered brain protein expression profiles are associated with molecular neurological dysfunction in the PKU mouse model*. J Neurochem, 2014. **129**(6): p. 1002-12.
25. Bruinenberg, V.M., et al., *A Specific Nutrient Combination Attenuates the Reduced Expression of PSD-95 in the Proximal Dendrites of Hippocampal Cell Body Layers in a Mouse Model of Phenylketonuria*. Nutrients, 2016. **8**(4): p. 185.
26. Lu, L., et al., *AMP-activated protein kinase activation in mediating phenylalanine-induced neurotoxicity in experimental models of phenylketonuria*. J Inherit Metab Dis, 2018. **41**(4): p. 679-687.
27. van der Goot, E., et al., *Hippocampal microglia modifications in C57Bl/6 Pah(enu2) and BTBR Pah(enu2) phenylketonuria (PKU) mice depend on the genetic background, irrespective of disturbed sleep patterns*. Neurobiol Learn Mem, 2019. **160**: p. 139-143.
28. Koppes, E.A., et al., *A porcine model of phenylketonuria generated by CRISPR/Cas9 genome editing*. JCI Insight, 2020. **5**(20).
29. Singh, K., et al., *CRISPR/Cas9 generated knockout mice lacking phenylalanine hydroxylase protein as a novel preclinical model for human phenylketonuria*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 7254.
30. Fiori, E., et al., *Early-onset behavioral and neurochemical deficits in the genetic mouse model of phenylketonuria*. PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0183430.
31. De Jaco, A., et al., *Unbalance between Excitation and Inhibition in Phenylketonuria, a Genetic Metabolic Disease Associated with Autism*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(5).
32. Paolicelli, R.C., et al., *Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development*. Science, 2011. **333**(6048): p. 1456-8.
33. Joseph, B. and C.A. Dyer, *Relationship between myelin production and dopamine synthesis in the PKU mouse brain*. J Neurochem, 2003. **86**(3): p. 615-26.
34. Frotscher, M., S. Zafirov, and B. Heimrich, *Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus*. Prog Neurobiol, 1995. **45**(2): p. 143-64.
35. Vinci, M., et al., *Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation*. BMC Biol, 2012. **10**: p. 29.
36. Hoeks, M.P., M. den Heijer, and M.C. Janssen, *Adult issues in phenylketonuria*. Neth J Med, 2009. **67**(1): p. 2-7.
37. Sawin, E.A., S.G. Murali, and D.M. Ney, *Differential effects of low-phenylalanine protein sources on brain neurotransmitters and behavior in C57Bl/6-Pah(enu2) mice*. Mol Genet Metab, 2014. **111**(4): p. 452-61.
38. Awasthi, J.R., et al., *Comprehensive topographical map of the serotonergic fibers in the male mouse brain*. J Comp Neurol, 2021. **529**(7): p. 1391-1429.
39. Kramar, C.P., et al., *The late consolidation of an aversive memory is promoted by VTA dopamine release in the dorsal hippocampus*. Eur J Neurosci, 2021. **53**(3): p. 841-851.
40. McNamara, C.G. and D. Dupret, *Two sources of dopamine for the hippocampus*. Trends Neurosci, 2017. **40**(7): p. 383-384.
41. Stoppini, L., P.A. Buchs, and D. Muller, *A simple method for organotypic cultures of nervous tissue*. J Neurosci Methods, 1991. **37**(2): p. 173-82.
42. Meseke, M., et al., *Distal Dendritic Enrichment of HCN1 Channels in Hippocampal CA1 Is Promoted by Estrogen, but Does Not Require Reelin*. eNeuro, 2018. **5**(5).
43. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.

44. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
45. Meyer, D., T. Bonhoeffer, and V. Scheuss, *Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity*. Neuron, 2014. **82**(2): p. 430-43.
46. Vlachos, A., et al., *Synaptopodin regulates denervation-induced homeostatic synaptic plasticity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(20): p. 8242-7.
47. Segal, M., *Dendritic spines: Morphological building blocks of memory*. Neurobiol Learn Mem, 2017. **138**: p. 3-9.
48. Korkotian, E., M. Frotscher, and M. Segal, *Synaptopodin regulates spine plasticity: mediation by calcium stores*. J Neurosci, 2014. **34**(35): p. 11641-51.
49. Gordon, S.L., R.E. Leube, and M.A. Cousin, *Synaptophysin is required for synaptobrevin retrieval during synaptic vesicle endocytosis*. J Neurosci, 2011. **31**(39): p. 14032-6.
50. Sutton, K. and S. Thurman, *Challenging communication: people with learning disabilities who challenge services*. Int J Lang Commun Disord, 1998. **33 Suppl**: p. 415-20.
51. Hetz, C. and S. Saxena, *ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration*. Nat Rev Neurol, 2017. **13**(8): p. 477-491.
52. del Rio, J.A. and E. Soriano, *Regenerating cortical connections in a dish: the entorhino-hippocampal organotypic slice co-culture as tool for pharmacological screening of molecules promoting axon regeneration*. Nat Protoc, 2010. **5**(2): p. 217-26.
53. Yu, T., et al., *P2Y12 regulates microglia activation and excitatory synaptic transmission in spinal lamina II neurons during neuropathic pain in rodents*. Cell Death Dis, 2019. **10**(3): p. 165.
54. Peng, J., et al., *Microglial P2Y12 receptor regulates ventral hippocampal CA1 neuronal excitability and innate fear in mice*. Mol Brain, 2019. **12**(1): p. 71.
55. Badimon, A., et al., *Negative feedback control of neuronal activity by microglia*. Nature, 2020. **586**(7829): p. 417-423.
56. Schafer, D.P., et al., *Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner*. Neuron, 2012. **74**(4): p. 691-705.
57. Stephan, A.H., B.A. Barres, and B. Stevens, *The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease*. Annu Rev Neurosci, 2012. **35**: p. 369-89.
58. Stevens, B., et al., *The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1164-78.
59. Kim, H.J., et al., *Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects*. Mol Psychiatry, 2017. **22**(11): p. 1576-1584.

### 3. Zusammenfassung

Die Erkrankung Phenylketonurie (PKU) ist eine angeborene Stoffwechselerkrankung, ausgelöst durch Mutationen des Phenylalanin-Hydroxylase (PAH)-Gens. Durch die Mutation kommt es bei der PKU zu einer Akkumulation von Phenylalanin (Phe), einem Mangel an Tyrosin (Tyr) sowie einer reduzierten Synthese von Katecholamin-Neurotransmittern. Das klinische Bild der PKU ist geprägt durch eine schwere geistige Retardierung sowie das Auftreten von epileptischen Anfällen bereits im frühen Kindesalter. Trotz großer Forschungsbestrebungen und zahlreichen experimentellen PKU-Studien, bleibt der exakte Einfluss hoher Phe-/niedriger Tyr-Spiegel auf den Phänotyp der PKU unbekannt. Unter Verwendung organotypischer hippokampaler Schnittkulturen und einem optimierten Kulturmedium untersuchten wir den direkten Einfluss hoher Phe-/niedriger Tyr-Spiegel auf die synaptische und gliale Integrität bei der PKU. Der Hippokampus eignet sich zur Beantwortung dieser Fragestellung hervorragend, da diese Hirnregion keine intrinsische Katecholamin-Neurotransmitter-Synthese besitzt. Dies bietet die Möglichkeit den Effekt hoher Phe-/niedriger Tyr-Spiegel losgelöst von potenziellen neurotoxischen Effekten einer dysregulierten Katecholamin-Neurotransmitter-Synthese zu betrachten. Wir verglichen Kulturen, die hohen Phe-/Tyr-Spiegeln und Kulturen, die physiologischen Phe-/Tyr-Spiegeln ausgesetzt waren. Mithilfe von Capillary Western Blots und immunohistochemischen Untersuchungen analysierten wir die Expression verschiedener synaptischer Proteine (PSD95, Synaptopodin, SNAP25, Synaptophysin), Gliazellmarker (GFAP, Iba1, P2Y12, CD68, C3b) und die Gliazell-Morphologie. Wir konnten eine transiente Herunterregulation des postsynaptischen Proteins PSD95 sowie des präsynaptischen Proteins SNAP-25 nach drei Wochen Kultur zeigen. Spannenderweise normalisierte sich im weiteren Verlauf der Kultur dieses Expressionsmuster, sodass bereits nach 6 Wochen Kultur kein Effekt mehr vorhanden war. Das Expressionsmuster glialer Proteine zeigte sich während der gesamten Zeit völlig unauffällig. Unsere Ergebnisse zeigen, dass hohe Phe-/niedrige Tyr-Spiegel keinen direkten Einfluss auf die synaptische und gliale Funktion ausüben und damit wahrscheinlich nicht die Ursache der geistigen Retardierung bei der PKU sind, sondern vielmehr eine dysregulierte Katecholamin-Neurotransmitter-Synthese zum Phänotyp der PKU führt.

Phenylketonuria (PKU) is an inborn error of Phenylalanine (Phe) metabolism caused by mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene. The deficiency of PAH leads to an accumulation of Phe, a deficit of tyrosine (Tyr), and a reduced catecholamine neurotransmitter synthesis. Untreated PKU patients develop severe cognitive deficits, seizures and a musty body odor early in life. Despite great biochemical characterization of PKU, the exact contribution of high Phe/low Tyr levels to the phenotype of the disease remain unknown. Using organotypic hippocampal slice cultures in an optimized culture medium, we examined synaptic and glial integrity in PKU. Since catecholamine neurotransmitters are not directly synthesized in the hippocampus, alterations in the catecholamine neurotransmitter synthesis can be neglected here. This offers the opportunity to investigate the potential direct neurotoxic effect of high Phe/low Tyr levels, apart from the subsequent disturbed catecholamine neurotransmitter synthesis. We compared cultures exposed to high Phe/low Tyr and cultures exposed to physiological Phe/Tyr levels. Using capillary western blot analysis and immunohistochemistry, we analyzed the expression of several synaptic proteins (PSD95, synaptopodin, SNAP25, synaptophysin), glial cell markers (GFAP, Iba1, P2Y12, CD68, C3b), and glial cell morphology. Our data showed a transient downregulation of the postsynaptic protein PSD95, as well as the presynaptic protein SNAP-25 after 3 weeks of culture. Excitingly, the expression of these proteins recovered in the further course and completely returned to baseline after 6 weeks of culture. The expression pattern of glial proteins was completely unremarkable throughout the period. Our results indicate that high Phe/low Tyr themselves are not the cause of mental retardation in PKU. Instead, a reduced catecholamine neurotransmitter synthesis might lead to mental retardation in PKU.

#### **4. Erklärung des Eigenanteils**

In der vorliegenden Studie wurden die Experimente durch Julian Kylies in Zusammenarbeit mit Dr. Bianka Brunne und den Medizinisch-Technischen-Assistenten (MTAs) des Instituts für Neuroanatomie durchgeführt. Die Präparation der Slice-Kulturen (Enthauptung der Mäuse, Präparation der Gehirne, Anlegen der Kulturen) wurde durch Julian Kylies in Zusammenarbeit mit den MTAs des Instituts durchgeführt. Die Durchführung der Capillary Western Blots, Immunfluoreszenz-Färbungen, Mikroskopie, Bildanalyse und quantitative Datenerhebung wurde durch Julian Kylies durchgeführt. Dr. Bianka Brunne erfüllte hierbei eine beratende Tätigkeit. Die statistische Auswertung erfolgte durch Julian Kylies. Das Konzept der Studie stammte von Frau Prof. Gabriele Rune. Die Interpretation der Ergebnisse sowie das Schreiben der Publikation erfolgte durch Frau Prof. Gabriele Rune und Julian Kylies.

#### **5. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Gabriele Rune und Frau Dr. Bianka Brunne für die ausgezeichnete Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei meinem Bruder Dr. Dominik Kylies bedanken, der mich auf meinem Weg mit Rat begleitet hat. Bei meiner Partnerin Greta Hübener bedanke ich mich für die Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation. Meinen Eltern danke ich für ihre Ermutigungen während des gesamten Prozesses der Dissertation.

## **6. Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen**

## **7. 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.

Unterschrift: .....