

**Mentale Retardierung bei Phenylketonurie:  
Einfluss erhöhter Phenylalaninspiegel  
auf die synaptische Konnektivität  
im Hippocampus**

Dissertation

zur Erlangung der Würde des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik

und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Gudrun Schlegel

aus Freiburg im Breisgau

Hamburg

März 2015





Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2011 bis März 2015 im Institut für Neuroanatomie am Zentrum für Experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriele M. Rune angefertigt.

1. Gutachterin: Prof. Dr. Elke Oetjen
2. Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele M. Rune

Tag der Disputation: 16.07.2015



*„The secret of genius is to carry the spirit of the child into old age,  
which means never losing your enthusiasm“*

Aldous Huxley (1894 – 1963), brit. Schriftsteller



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>XV</b>
<b>Summary.....</b>	<b>XVII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Phenylketonurie, eine Einführung.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Geschichte.....	1
1.1.2 Inzidenzzahlen .....	1
1.1.3 Genotyp und Phänotyp.....	2
1.1.4 Folgen des Enzymdefekts .....	2
1.1.5 Therapie .....	4
<b>1.2 Der Hippocampus und seine Funktion.....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Regionen des Hippocampus.....	5
1.2.2 Dreischichtigkeit des Hippocampus.....	6
1.2.3 Die Zellen des Hippocampus .....	6
1.2.4 Neuronale Verschaltung des Hippocampus .....	8
1.2.5 Funktion des Hippocampus.....	9
<b>1.3 Das Neuron .....</b>	<b>10</b>
1.3.1 Aufbau einer Nervenzelle .....	10
1.3.2 Aufbau und Regulation des Zytoskeletts .....	11
1.3.3 Synaptische Übertragung .....	13
<b>1.4 Mikroglia und synaptisches Pruning.....</b>	<b>15</b>
<b>1.5 Derzeitiger Wissensstand: Mentale Retardierung in PKU .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6 Aufgabenstellung der Arbeit.....</b>	<b>19</b>
<b>2 Ergebnisse.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Phenylalanin hat keinen Effekt auf die Vitalität hippocampaler Neurone .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Phenylalanin beeinflusst <i>in-vitro</i> die Dendritogenese .....</b>	<b>24</b>
2.2.1 Charakterisierung des Dendritenbaums nach Phenylalaninbehandlung .....	25
2.2.2 Charakterisierung des proximalen Dendritenbaums .....	26

<b>2.3</b>	<b>Einfluss von Phenylalanin auf das Axonwachstum.....</b>	<b>28</b>
<b>2.4</b>	<b>Beeinflussung der synaptischen Konnektivität durch Phenylalanin.....</b>	<b>31</b>
2.4.1	Phenylalanin beeinflusst direkt die Entwicklung von Spinesynapsen .....	31
2.4.2	Phenylalanin beeinflusst die <i>in-vitro</i> Spinogenese .....	33
2.4.3	Phenylalanin beeinflusst die Expression der präsynaptischen Proteine Synaptophysin, Synaptobrevin und Snap-25 .....	35
2.4.4	Phenylalanin beeinflusst die Expression des postsynaptischen Proteins Spinophilin, nicht jedoch die Expression von Synaptopodin .....	38
<b>2.5</b>	<b>Beeinflussung der Signaltransduktion durch Phenylalanin.....</b>	<b>41</b>
2.5.1	Phenylalanin beeinflusst die Aktivität des Aktin-assoziierten Proteins Cofilin ..	41
2.5.2	Phenylalanin beeinflusst die Aktivität der GTPase Rac1 .....	45
2.5.3	Phenylalanin beeinflusst die Aktivität der CaMKII.....	46
<b>2.6</b>	<b>Beeinflusst Phenylalanin die Aktivität von Mikroglia?.....</b>	<b>49</b>
2.6.1	Reduzierte Aktivität von Mikroglia in adulten <i>Pah<sup>enu2</sup></i> Mäusen .....	50
2.6.2	Reduzierte mRNA Level in der <i>Pah<sup>enu2</sup></i> Maus .....	51
2.6.3	Einfluss von Phenylalanin auf die Mikrogliaaktivität.....	52
<b>3</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>Phenylalanin hat einen direkten Einfluss auf die Entwicklung hippocampaler Neurone <i>in-vitro</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>3.2</b>	<b>Phenylalanin beeinflusst die Expression präsynaptischer Proteine .....</b>	<b>59</b>
<b>3.3</b>	<b>Phenylalanin beeinflusst die postsynaptische Proteinexpression .....</b>	<b>61</b>
<b>3.4</b>	<b>Phenylalanin beeinflusst das Aktinzytoskelett .....</b>	<b>63</b>
<b>3.5</b>	<b>Phenylalanin beeinflusst dosisabhängig den CaMKII-Rac1-vermittelten Signalweg .....</b>	<b>65</b>
<b>3.6</b>	<b>Mikroglia sind am verzögerten synaptische Pruning in PKU beteiligt.....</b>	<b>67</b>
<b>3.7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>69</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>71</b>
4.1.1	Versuchstiere.....	71
4.1.2	Zellkultur.....	71
4.1.3	Antikörper .....	72
4.1.4	Bakterienstämme.....	73
4.1.5	Vektoren.....	74

4.1.6	Oligonukleotide.....	74
4.1.7	Restriktionsenzyme.....	74
4.1.8	Größenstandards.....	75
4.1.9	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	75
4.1.10	Kits.....	76
4.1.11	Geräte.....	76
4.1.12	Software.....	78
<b>4.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>78</b>
4.2.1	Zellbiologische Methoden.....	78
4.2.1.1	Primäre hippocampale Dispersionskultur.....	79
4.2.1.2	Hippocampale organotypische Gewebekultur.....	80
4.2.1.3	Immortalisierte Zelllinie HEK-293.....	80
4.2.1.4	Mediumwechsel und Phenylalaninstimulation.....	81
4.2.1.5	Kurzzeitstimulation mit NMDA.....	81
4.2.1.6	Transfektion mit Effectene® Transfektionsreagenz.....	82
4.2.1.7	Transiente Transfektion durch Kalzium-Phosphat-Präzipitation.....	82
4.2.1.8	Fixierung der Kulturen.....	83
4.2.1.9	Herstellung von Zelllysaten für Proteinanalysen.....	84
4.2.2	<i>Pah<sup>enu2</sup></i> Maus.....	85
4.2.2.1	Genotypisierung der <i>Pah<sup>enu2</sup></i> Maus.....	85
4.2.3	Elektronenmikroskopie.....	86
4.2.3.1	Fixierung des Gewebes für die Elektronenmikroskopie.....	86
4.2.3.2	Eponeinbettung.....	86
4.2.3.3	Aufnahmen mit TEM und Bildanalyse.....	88
4.2.4	Immunhistochemische Methoden.....	88
4.2.4.1	Immuncytochemie.....	89
4.2.4.2	Fluoreszenzmikroskopie und Intensitätsanalyse.....	89
4.2.4.3	Apoptosenachweis mittels TUNEL-Assay.....	90
4.2.4.4	Sholl-Analyse.....	91
4.2.4.5	Proximaler Dendritenabschnitt.....	91
4.2.4.6	Evaluierung der Spinedichte und -morphologie.....	91
4.2.5	Molekularbiologische Methoden.....	92
4.2.5.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	92
4.2.5.2	Extraktion und Reinigung von mRNA.....	92

## Inhaltsverzeichnis

4.2.5.3	cDNA Synthese mittels Reverser Transkriptase.....	93
4.2.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	93
4.2.5.5	<i>Real-time</i> quantitative PCR.....	94
4.2.5.6	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	96
4.2.5.7	Midipräparation von Plasmid DNA.....	97
4.2.5.8	Glycerolkulturen.....	97
4.2.5.9	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme.....	97
4.2.5.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	98
4.2.5.11	DNA-Sequenzierung.....	98
4.2.5.12	Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i> .....	98
4.2.6	Biochemische Methoden.....	99
4.2.6.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	99
4.2.6.2	SDS-Page.....	100
4.2.6.3	Coomassie-Färbung.....	101
4.2.6.4	Immunblot (Western Blot).....	101
4.2.6.5	Immundetektion mittels Meerrettichperoxidase.....	103
4.2.6.6	GST-Pulldown.....	103
4.2.7	Statistik.....	104
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>105</b>
	<b>5 Anhang.....</b>	<b>115</b>
5.1	<b>Eingesetzte Chemikalien.....</b>	<b>115</b>
5.2	<b>H- und P -Sätze des GHS.....</b>	<b>119</b>
5.3	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>123</b>
5.4	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>124</b>
5.5	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>125</b>
5.6	<b>Wissenschaftlicher Werdegang.....</b>	<b>127</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>121</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>123</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Absorption
Abb.	Abbildung
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
APS	Ammoniumpersulfat
Aq. dest.	destilliertes Wasser
BSA	Rinderalbumin
c	Stoffmengenkonzentration
CA	Cornu Ammonis, Ammonshorn
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> / Calmodulin abhängige Kinase II
CCD	charge-coupled device (ladungsgekoppeltes Bauelement)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CT	cycle threshold (Schwellenwert)
CX3CR1	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDSA	2-Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid
DEPC	Diethyldicarbonat
DIV	„Days in-vitro“
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E	Embryonaltag
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
G	Gauge
g, mg, $\mu$ g	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
GOI	englisch: gene of interest
GST	Glutathion-S-Transferase

## Abkürzungsverzeichnis

<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>GTP<math>\gamma</math>S</b>	Guanosine-5'-O-[gamma-thio]-triphosphat
<b>h</b>	Stunde
<b>HBSS</b>	Hank's Balanced Salts
<b>HEK293</b>	Humane embryonale Nierenzelllinie
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HKG</b>	englisch: house keeping gene, Haushaltsgen
<b>HPRT</b>	Hypoxanthin-phosphoribosyl-transferase
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>Iba-1</b>	englisch: ionized calcium-binding adapter molecule 1
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<b>KO</b>	Knockout
<b>Ktr.</b>	Kontrolle
<b>l, ml, <math>\mu</math>l</b>	Liter, Milliliter, Mikroliter
<b>LB</b>	englisch: lysogeny broth
<b>M, mM, <math>\mu</math>M</b>	Molar (1 Mol/l), millimolar, mikromolar
<b>MAP2</b>	Microtubuli-assoziiertes Protein 2
<b>MEM</b>	Minimum Essential Medium
<b>min.</b>	Minuten
<b>MNA</b>	1-Methyl-5-norbornen-2,3-dicarbon-säureanhydrid
<b>mRNA</b>	messenger Ribonukleinsäure (Boten-RNA)
<b>NGS</b>	normales Ziegenserum
<b>NMDA</b>	N-Methyl-D-Aspartat
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>P</b>	Postnatal
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PAH</b>	Phenylalaninhydroxylase
<b>PBD</b>	“Rac-Binding Domain”
<b>PBS</b>	Phosphate-Buffered Saline (Phosphat-gefufferte Salzlösung)
<b>pCaMKII</b>	phosphorylierte Ca <sup>2+</sup> / Calmodulin abhängige Kinase II
<b>PCR</b>	Poylmerase-Kettenreaktion
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>Phe</b>	Phenylalanin
<b>PKU</b>	Phenylketonurie
<b>Rac1</b>	Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrat 1

<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>rpm</b>	englisch: revolutions per minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SEM</b>	englisch: standard error of the mean, Standardfehler
<b>Snap-25</b>	Synaptosomal-associated protein 25
<b>T</b>	Tween-20
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA-Puffer
<b>TBS</b>	Tris-Buffered Saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
<b>TdT</b>	terminale-Desoxyribonukleotidytransferase
<b>TEM</b>	Transmissionselektronenmikroskop
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>TUNEL</b>	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
<b>ÜN</b>	über Nacht
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>Vd</b>	Verdünnungsfaktor
<b>WT</b>	Wildtyp



## Zusammenfassung

Die humane Stoffwechselerkrankung Phenylketonurie (PKU) zeichnet sich durch stark erhöhte Konzentrationen der Aminosäure in Plasma und Liquor aus. Verursacht wird die Zunahme der Aminosäurekonzentration durch einen genetisch bedingten Funktionsverlust des Enzyms Phenylalaninhydroxylase, welches die Aminosäure in den Metaboliten Tyrosin hydroxyliert. In Folge der Mutation sind betroffene Kinder postnatal regelhaft mental retardiert. Die zugrunde liegenden Pathomechanismen dieser mentalen Retardierung sind nicht geklärt.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus, einem etablierten PKU Mausmodell, zeigten ein deutlich verzögertes synaptisches Pruning im Hippocampus, was zu einer signifikant erhöhten Anzahl an Synapsen in adulten Tieren führte. Postnatales synaptisches Pruning dient der Elimination schwacher Synapsen durch Mikroglia, deren Aktivierung C3-Komplement abhängig ist. Die erhöhte Anzahl an Synapsen war von einer reduzierten Expression präsynaptischer Proteine und einer erhöhten Expression postsynaptischer Proteine begleitet. In elektrophysiologischen Untersuchungen wurde zudem deutlich reduzierte neuronale Aktivität nachgewiesen (Horling and Schlegel et al., 2014). Im Ergebnis ist davon auszugehen, dass die synaptische Konnektivität im Hippocampus durch verzögertes synaptisches Pruning nachhaltig gestört ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht welche dieser Effekte auf die synaptische Konnektivität auf die hohen Konzentrationen von Phenylalanin bei der Phenylketonurie zurückzuführen sind. Aus diesem Grund wurden Analysen an den etablierten Modellen der hippocampalen Dispersionskultur sowie der organotypischen hippocampalen Gewebekultur durchgeführt. Der Hippocampus ist für das Lernen und die Gedächtniskonsolidierung elementar und deshalb für Untersuchungen zu mentaler Retardierung besonders geeignet.

In den hippocampalen Dispersionskulturen führten stark erhöhte Konzentrationen von Phenylalanin zu einer reduzierten Dendritenverzweigung, gering gradig erhöhte hingegen zu einer gesteigerten. Dosisunabhängig kam es dagegen zu einer Erhöhung der Spindichte. Die Expression der untersuchten präsynaptischen Proteine war durch Phenylalanin herunterreguliert, hingegen die der postsynaptischen Proteine

heraufreguliert. In den organotypischen Gewebekulturen bewirkte Phenylalanin eine Reduktion der Anzahl an Spinesynapsen in der CA1 Region, in der CA3 Region dagegen dosisabhängig eine gesteigerterten Anzahl. Untersuchungen des Einflusses von Phenylalnin auf das Aktinzytoskelett zeigten einen deutlichen Einfluss höherer Konzentrationen auf dessen Ausbildung und Reorganisation. Phenylalanin beeinflusste dosisabhängig die Expression der Proteine CaMKII und Rac1, die im Rahmen eines zusammenhängenden Signalwegs, der die gefundenen morphologischen Veränderungen verursachen könnte, untersucht wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob Phenylalanin die Mikroglia beeinflusst. In der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus konnte eine reduzierte Mikrogliaaktivität im Hippocampus adulter Tiere gezeigt werden. mRNA Messungen zeigten zudem eine mögliche Beteiligung des Komplementfaktors C3 und des Rezeptors CX3CR1 im Mausmodell auf. Untersuchungen in hippocampalen Gewebekulturen hingegen machten deutlich, dass Phenylalanin keinen direkten Einfluss auf die Aktivität der Mikroglia besitzt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie deutlich die Notwendigkeit der lebenslangen, Phenylalanin-reduzierten Diät Betroffener auf, da Phenylalanin nicht nur über die verminderte Aktivierung von Mikrogliazellen Einfluss auf die frühe postnatale Entwicklung nimmt, sondern auch direkt die Morphologie und Funktionalität hippocampaler Neurone nachteilig beeinflusst. Die Untersuchungen bilden die Grundlage für weiterführende Analysen mit der Möglichkeit, eine zukünftige alternative Therapieoption zu entwickeln.

## Summary

The human metabolic disorder phenylketonuria (PKU) is characterized by elevation of the amino acid phenylalanine in plasma and liquor. This is due to genetic loss of function of the enzyme phenylalanine hydroxylase, phenylalanine is not hydroxylated into its metabolite tyrosine. Subsequently, the children affected develop a severe mental retardation postnatally. The underlying pathomechanisms of the mental retardation are still unknown.

Studies of our group have revealed delayed synaptic pruning in the hippocampus of the *Pah<sup>enu2</sup>* mouse, a well established PKU model. This delay results in a significantly increased number of synapses in adult animals. Postnatal synaptic pruning leads to the elimination of weak synapses by microglia, which are activated in a C3-complement-dependent manner. The increased number of synapses is accompanied by a reduced expression of presynaptic proteins and an increased expression of postsynaptic proteins. Furthermore, electrophysiological examinations have revealed an obvious reduction in neuronal activity (Horling and Schlegel et al., 2014). In summary, we can assume that synaptic connectivity is sustainably disturbed due to delayed synaptic pruning.

In this study the question was analysed as to which of the effects on synaptic connectivity is caused by the elevated levels of phenylalanine occurring by phenylketonuria. Therefore, analyses were performed in the well-established models of hippocampal dispersion culture and hippocampal slice culture. The hippocampus is crucial for learning and memory and is therefore an appropriate subject for research concerning mental retardation.

In hippocampal dispersion cultures high concentrations of phenylalanine resulted in reduced dendritic arborization. Slightly elevated concentrations, however, resulted in increased dendritic arborization. Phenylalanine resulted dose-independently in an increase in spine density. The expression of the presynaptic proteins was downregulated by elevated levels of phenylalanine, whereas the expression of postsynaptic proteins was upregulated. In hippocampal slice cultures, phenylalanine reduced the number of spine synapses in the CA1 region, but resulted dose-dependently in an increased amount in the CA3 region. Examination of the influence of phenylalanine on the actin cytoskeletal showed a direct effect of elevated levels on the formation and rearrangement. Phenylalanine also affected the expression of the proteins CaMKII and Rac1 dose-

dependently. The proteins are part of a signaling pathway leading to the morphological alterations found in hippocampal dispersion cultures.

The second part of the study focuses on the influence of phenylalanin on microglia activity. In the hippocampus of adult *Pah<sup>enu2</sup>* mice reduced microglia activity was found. This was accompanied by reduced mRNA levels of the complement component C3 and the receptor CX3CR1. Examinations in hippocampal slice cultures clearly demonstrate that phenylalanine does not directly influence the activity of microglia.

In conclusion the findings of this study clearly demonstrate the necessity of a lifelong phenylalanine-restricted diet for PKU patients, as the amino acid influences not only early postnatal development by reduced activation of microglia but also directly affects the morphology and functionality of hippocampal neurons. The findings are a basis for continuing analyses, regarding the development of alternative therapeutical options.

# 1 Einleitung

## 1.1 Phenylketonurie, eine Einführung

Die genetisch bedingte Stoffwechselerkrankung Phenylketonurie (PKU; OMIM # 261600) bezeichnet eine Erkrankung des Aminosäurestoffwechsels, bei der die essentielle Aminosäure L-Phenylalanin (Phe) durch einen Defekt des leberständigen Enzyms Phenylalaninhydroxylase (*PAH*; EC 1.14.16.1) nicht metabolisiert werden kann (Williams et al., 2008).

PKU wird in den meisten Industrieländern durch das Neugeborenencreening erfasst. Die Erkrankung führt unbehandelt zu einer postnatalen Entwicklungsstörung des Zentralen Nervensystems (ZNS) mit der Ausbildung einer schwerwiegenden, mentalen Retardierung.

### 1.1.1 Geschichte

Die Krankheit wurde erstmals 1934 von dem norwegischen Arzt und Biochemiker Asbjørn Følling beschrieben (Folling, 1934). Durch chemische Analysen diverser Urinproben zweier intellektuell eingeschränkter Geschwister konnte er eine erhöhte Konzentration der organischen Substanz Phenylbrenztraubensäure feststellen (Folling, 1994). Die erhöhte Menge des Abbauproduktes im Urin mit der einhergehenden geistigen Behinderung der Kinder führte zu dem Krankheitsnamen „imbezillitas phenylpyruvica“, welcher später in Phenylketonurie geändert wurde (Penrose and Quastel, 1937). Die zugrunde liegende Dysfunktion des Enzyms, verbunden mit der mangelnden Umsetzung von Phe in Tyrosin, wurde von Dr. George Jervis beschrieben (Jervis, 1947, 1953). Bereits in den fünfziger Jahren wurde von Dr. Horst Bickel die Phe-arme Diät mit der zusätzlichen Supplementierung der Aminosäuren als Therapie der PKU vorgestellt (Bickel et al., 1953).

### 1.1.2 Inzidenzzahlen

In Deutschland tritt die Erkrankung mit einer Inzidenz von 1:7.400 (Bickel et al., 1981) auf. Es kommt allerdings zu ethnischen Häufungen, wie z. B. in der Türkei. Dort findet

man die Erkrankung mit der weltweit höchsten Wahrscheinlichkeit von 1:4.200 (Ozalp et al., 2001). In Finnland hingegen beträgt die Inzidenz nur 1:100.000 (Guldberg et al., 1995). Weltweit sind überwiegend die weiße und asiatische Bevölkerung betroffen.

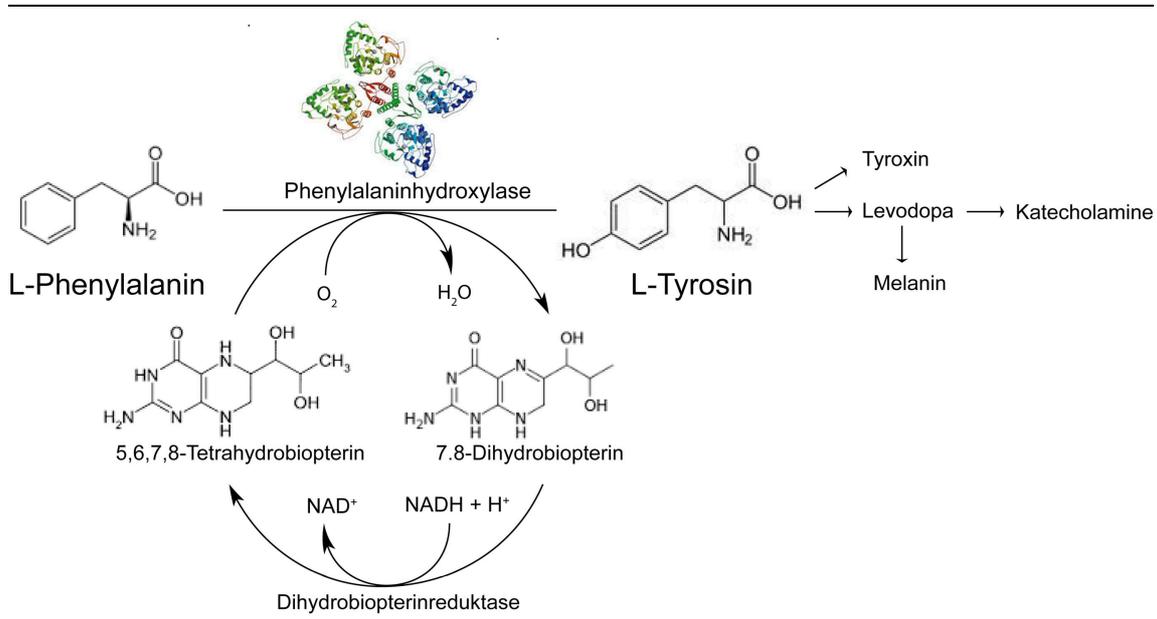
### 1.1.3 Genotyp und Phänotyp

Das für die PAH kodierende Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 12 im Abschnitt 22→24.1 (12q22→12q24.1)(Lidsky et al., 1985). In den meisten Fällen wird die Genveränderung durch eine Punktmutation verursacht. Dabei kommt es am häufigsten zu sinnverändernden Mutationen (missense mutation), bei denen der Austausch einer einzelnen Base zur Kodierung einer alternativen Aminosäure führt. Die Translation des ursprünglichen Proteins, hier Phenylalaninhydroxylase, kann in der Folge nicht adäquat stattfinden. Die in Deutschland am häufigsten vorkommende Mutation ist die „missense“-Mutation R408W (Zschocke and Hoffmann, 1999). Mittlerweile sind über 800 unterschiedliche Mutationen des Gens bekannt. Neben den sinnverändernden Mutationen gibt es auch stille Mutationen (silent mutations), Deletionen und Insertionen. Abhängig vom Mutationstyp und der Lage der veränderten Mutation im Gen entstehen sehr unterschiedlich stark ausgeprägte Restaktivitäten des Enzyms (Scriver and Waters, 1999). Ein weiterer Aspekt, der zur Ausbildung der Mutationsvielfalt führt, ist das Auftreten kombinierter Heterozygotie (Kayaalp et al., 1997). Bei einer kombinierten Heterozygotie (Compound-Heterozygotie) besitzt der Betroffene durch die autosomal-rezessive Vererbung bedingt zwei unterschiedlich mutierte Allele für das *PAH*-Gen. Eine Restaktivität des Enzyms von 5 % ist ausreichend, um wie auch bei heterozygot Betroffene, keinerlei Krankheitssymptome aufzuweisen.

### 1.1.4 Folgen des Enzymdefekts

Das Enzym PAH benötigt für die Hydroxylierung von Phe den Kofaktor 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) und molekularen Sauerstoff (Abbildung 1-1). Der Funktionsverlust des Enzyms führt durch die fehlende Umwandlung der Aminosäure Phe zu ihrem Anstieg in Plasma und Liquor. Gleichzeitig kommt es zu einem Mangel der Aminosäure Tyrosin, welche dadurch zur essentiellen Aminosäure wird. Tyrosin ist an der Synthese des Schilddrüsenhormons L-Thyroxin beteiligt und ist Vorstufe von

Levodopa welches wiederum Vorstufe in der Synthese des Pigmentfarbstoffs Melanin und der Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin ist. Erkennbar ist der Melaninmangel oft an der hellen Hautfarbe sowie den blonden Haaren und blauen Augen der Betroffenen.



**Abbildung 1-1: Hydroxylierung von Phenylalanin**

Das Enzym PAH hydroxyliert mit Hilfe des Kofaktors 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) den Phenylring von Phe in para-Position. Das durch die Reaktion oxidierte BH<sub>4</sub> wird durch das Enzym Dihydrobiopterinreduktase, unter Zuhilfenahme des Koenzyms NADH, wieder reduziert.

Exkurs atypische PKU:

Störungen des BH<sub>4</sub> Zyklus fasst man unter dem Begriff atypische PKU zusammen (Blau et al., 2001). Verursacht werden können diese Störungen durch Aktivitätseinschränkungen des Enzyms Dihydrobiopterinreduktase oder aber durch Aktivitätseinschränkungen der an der Synthese des BH<sub>4</sub> beteiligten Enzyme. Die Behandlung der atypischen PKU erfolgt durch Supplementierung des Kofaktors BH<sub>4</sub> (INN: Sapropterin; Kuvan®, Merck Serono).

Während der Embryonalentwicklung sind die Leberfunktionen noch nicht komplett entwickelt. Die Aminosäure Phe wird in dieser Zeit durch die Leberfunktion der Mutter verstoffwechselt. Erste Folgen der mangelnden Enzymfunktion treten somit erst postnatal auf. Unbehandelt entwickeln die Betroffenen ab dem 4. Lebensmonat geistige

## Einleitung

Entwicklungsstörungen, welche zur Ausbildung einer schweren mentalen Retardierung mit IQ-Werten von  $< 30$  führen (Paine, 1957, Dobson et al., 1976). Weitere Folgen sind Veränderungen der weißen Substanz (Thompson et al., 1993) sowie Defizite in der Feinmotorik (Weglage et al., 1995) und der Konzentrationsfähigkeit (Weglage et al., 1996). Aggressive und psychotische Verhaltensauffälligkeiten führen häufig zu einer Heimunterbringung der Kinder (Stevenson et al., 1979). Ekzematöse Hautveränderungen sind ein weiteres, häufig auftretendes Symptom (Riva et al., 1994).

### Exkurs maternale PKU:

Unter maternaler PKU versteht man eine Embryofetopathie bei PKU der Schwangeren. Aufgrund der Plazentagängigkeit der Aminosäure Phe kann es durch erhöhte mütterliche Phe-Spiegel, zu intrauterinen Schädigungen des genetisch gesunden Fötus kommen (Levy and Ghavami, 1996). Häufige Symptome des Neugeborenen sind niedriges Geburtsgewicht, Mikrozephalie, Gesichtsfehlbildungen und angeborene Herzfehler (Lenke and Levy, 1980, Rouse et al., 2000, Knerr et al., 2005). Aus diesem Grund ist eine strenge Diät vor und besonders während einer Schwangerschaft notwendig (Drogari et al., 1987).

### **1.1.5 Therapie**

Durch das in Deutschland stattfindende neonatale Stoffwechselscreening kann die Erkrankung frühzeitig diagnostiziert werden. Mit Hilfe des Guthrie-Tests (Guthrie and Susi, 1963) oder heutzutage der Tandem-Massenspektroskopie werden erhöhte Phe-Spiegel im Blut gemessen. Stationäre Aufnahme der Säuglinge und anschließende Testverfahren, wie die Urin-Pterinanalyse und die Bestimmung der Dihydropteridin-Reduktase-Aktivität sichern die Diagnosestellung. Differenzialdiagnostisch wird zudem ein  $\text{BH}_4$ -Belastungstest durchgeführt, um eine klassische PKU von einer atypischen PKU zu unterscheiden (Mütze et al., 2011).

Um Entwicklungsschäden zu verhindern, muss umgehend mit einer lebenslangen, Phe-armen Diät begonnen werden (Burgard et al., 1999). Da es sich bei Phe um eine essentielle Aminosäure handelt, darf die Aufnahme nicht komplett verhindert werden (Kaufman, 1999). Aufgrund der verschiedenen Genotypen ergeben sich sehr unterschiedliche Phe-Intoleranzen. Die Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische

Stoffwechselstörungen (APS) empfiehlt für Kinder bis zum 10. Lebensjahr die Phe Level zwischen 0,7 – 4 mg/dl zu halten. Bei Kindern von 11 - 16 Jahren werden Werte bis 15 mg/dl toleriert und ab einem Alter von 16 Jahren liegt die Empfehlung bei Werten < 20 mg/dl. Mit Hilfe von Diät-Assistenten kann der Ernährungsplan individuell angepasst werden. Um Mangelerscheinungen durch die proteinarme Diät vorzubeugen, gibt es spezielle Aminosäuregemische, die zusätzlich zur Phe-armen Diät supplementiert werden müssen.

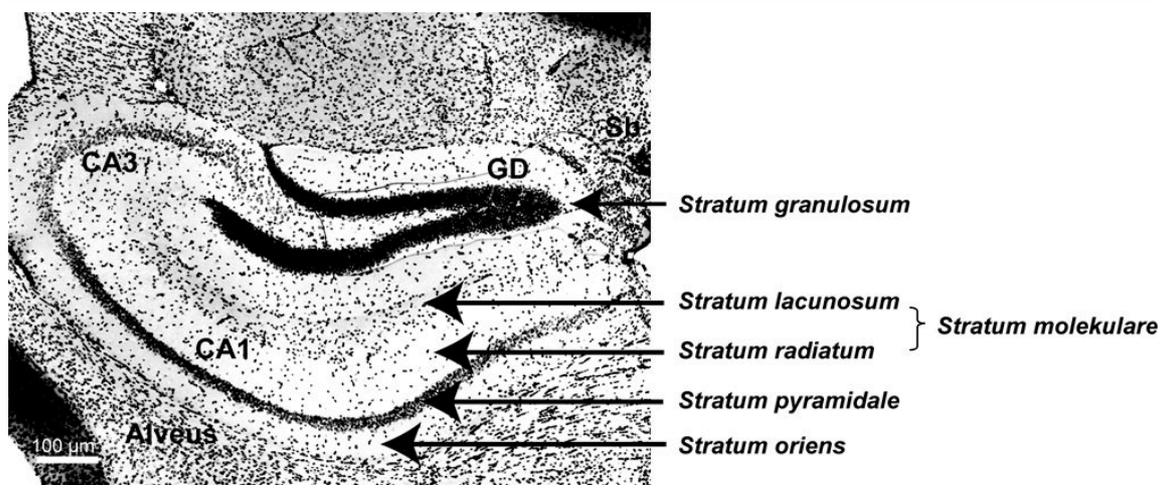
## **1.2 Der Hippocampus und seine Funktion**

Der Hippocampus, als größter Teil des Archicortex, befindet sich an der medialen Fläche des Temporallappens. Die gesamte Hippocampusformation erstreckt sich bis zum kaudalen Ende des Corpus Callosum (Balken). Sie besteht aus Hippocampus, Gyrus dentatus, und Subiculum und besitzt im Gegensatz zum phylogenetisch jüngeren, sechsschichtigen Neocortex einen dreischichtigen Aufbau.

Dem Hippocampus kommt eine entscheidende Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung zu (Milner, 1966, Zola-Morgan et al., 1986). Als Teil des limbischen Systems ist der Hippocampus auch an der Verarbeitung von Emotionen sowie der Kontrolle des Trieb- und Affektverhaltens beteiligt (Maclean, 1955, Papez, 1995).

### **1.2.1 Regionen des Hippocampus**

Der Hippocampus ist in drei Bereiche eingeteilt: den *Gyrus dentatus*, das *Cornu ammonis* (Ammonshorn) und das *Subiculum* (Abbildung 1-2).



**Abbildung 1-2: Aufbau Hippocampus**

Die Abbildung zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Hippocampusformation einer 12 Wochen alten *Pah<sup>enu2</sup>* Maus in schwarz-weiß. Entsprechend der Beschriftung sieht man das Zellband des Gyrus dentatus (GD) und das Cornu ammonis (CA), welches in CA1 und CA3 Region unterschieden werden kann. Das Subiculum ist nur angedeutet zu sehen. In schwarz sind die Zellkerne der jeweiligen Schicht zu sehen.

### 1.2.2 Dreischichtigkeit des Hippocampus

In Abbildung 1-2 sind die verschiedenen Schichten des Hippocampus dargestellt. Nach außen hin, an den Temporallappen grenzend, liegt dem Ammonshorn der Alveus auf. Diese Faserschicht enthält die afferenten und efferenten Fasern des Hippocampus. Nach innen schließen sich dem Alveus die drei klassischen Schichten des Hippocampus an. Die erste Schicht bildet das *Stratum oriens* (Korbzellschicht), gefolgt vom *Stratum pyramidale* (Pyramidenzellschicht) und schließlich, als letzte Schicht, das zellarme *Stratum moleculare* (Molekularschicht). Das *Stratum moleculare* lässt sich in ein *Stratum radiatum* und ein *Stratum lacunosum* unterteilen. Diese Unterteilung führt zu der synonym verwendeten, zusammenfassenden Bezeichnung *Stratum radiatum-lacunosum-moleculare*. Im Gyrus dentatus (GD) findet man statt des *Stratum pyramidale* das *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht).

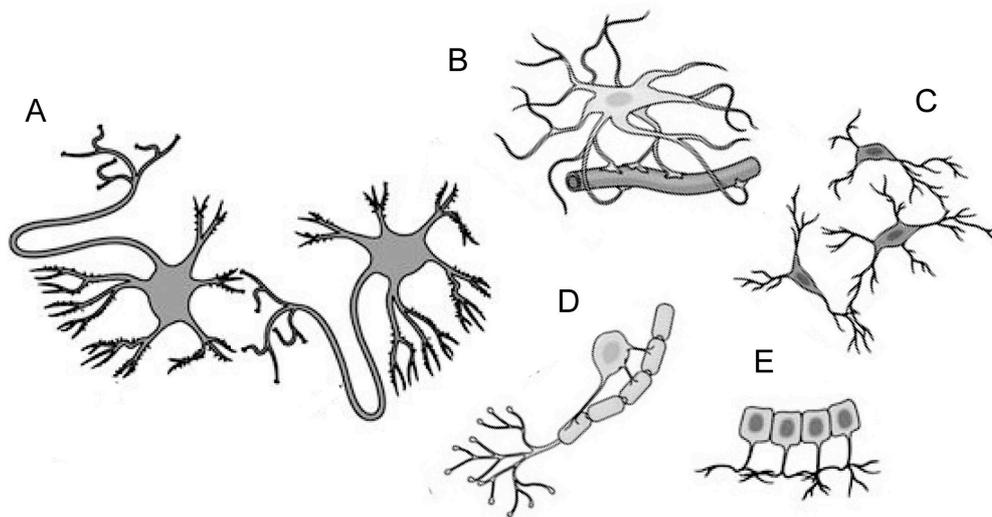
### 1.2.3 Die Zellen des Hippocampus

Die erste der drei Schichten, das *Stratum oriens*, wird von Korbzellen gebildet. Korbzellen sind multipolare Interneurone, die mit ihren Axonverzweigungen ein

Fasergeflecht („Korb“) um die Perikaryen der Pyramidenzellen (*Stratum pyramidale*) bilden. Sie enthalten den Neurotransmitter GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) und haben eine inhibitorische Funktion. Die Körnerzellen des *Stratum granulosum* bilden die kleinsten Nervenzellen. Sie besitzen einen Zellkern, der fast das komplette Soma ausfüllt. Als exzitatorisch wirkende Zellen nehmen sie Signale auf und leiten diese mit ihren Axonen als Moosfasern in anderen Regionen, wie die CA3 Region, weiter. Die Pyramidenzellen des *Stratum pyramidale* sind als Projektionsneurone für die Weiterleitung von Informationen im Hippocampus verantwortlich. Ihren Namen erhalten sie durch ihren pyramidenförmigen Zellkörper. Pyramidenzellen enthalten den erregenden Neurotransmitter Glutamat. Die letzte Schicht, das *Stratum moleculare*, wird aus Interneuronen und Gliazellen sowie den Axonendigungen und Dendriten der Pyramidenzellen gebildet.

Gliazellen sind eine sehr heterogene Gruppe nicht neuronaler Zellen. Im Hippocampus unterscheidet man u. a.:

1. Astrozyten, die für die Verbindung zu den Blutgefäßen sorgen und eine Stützfunktion ausüben. Sie sind zudem an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt.
2. Oligodendroglia, die mit ihren myelinhaltigen Axonen die Nervenzellen umhüllen und somit elektrisch isolieren.
3. Mikroglia, die apoptotische Neurone eliminieren und Fremdkörper sowie Zellfragmente phagozytieren.
4. Ependymzellen, die für die Auskleidung der inneren Liquorräume zuständig sind und an der Bildung der Blut-Liquor-Schranke beteiligt sind.



---

**Abbildung 1-3: Zelltypen im Hippocampus, modifiziert nach Jensen (Jensen, 2005)**

Die Abbildung zeigt schematisch die unterschiedlichen Zelltypen. A zeigt zwei hippocampale Neurone, B einen Astrozyt, C zeigt Mikroglia, D Oligodendroglia und E Ependymzellen.

#### **1.2.4 Neuronale Verschaltung des Hippocampus**

Die Reizweiterleitung im Hippocampus findet als sogenannte „trisynaptische Verschaltung“ statt. Afferente Fasern aus der *Area entorhinalis* (entorhinaler Cortex) ziehen zum größten Teil über den *Tractus perforans* zu den Körnerzellen des *Gyrus dentatus* (Abbildung 1-4, 1). Die Axone der Körnerzellen, die Moosfasern, bilden ihrerseits synaptische Kontakte mit den Dendriten der Pyramidenzellen in der CA3 Region (Abbildung 1-4, 2). Die Axone der Pyramidenzellen aus CA3 bilden mit den Dendriten der CA1 Pyramidenzellen als sogenannte Schaffer-Kollateralen Synapsen aus (Abbildung 1-4, 3). Der größte Teil der efferenten Fasern aus dem Hippocampus zieht anschließend zum Subiculum und zurück zum entorhinalen Cortex.



## Einleitung

Schädigungen an einem Hippocampus haben starke Auswirkungen auf die Merkfähigkeit. Neu Erlerntes kann nicht mehr vom Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis überführt werden. Schädigungen an beiden Hippocampi führen darüber hinaus zum Verlust der örtlichen und zeitlichen Orientierung und final zu einer anterograden Amnesie.

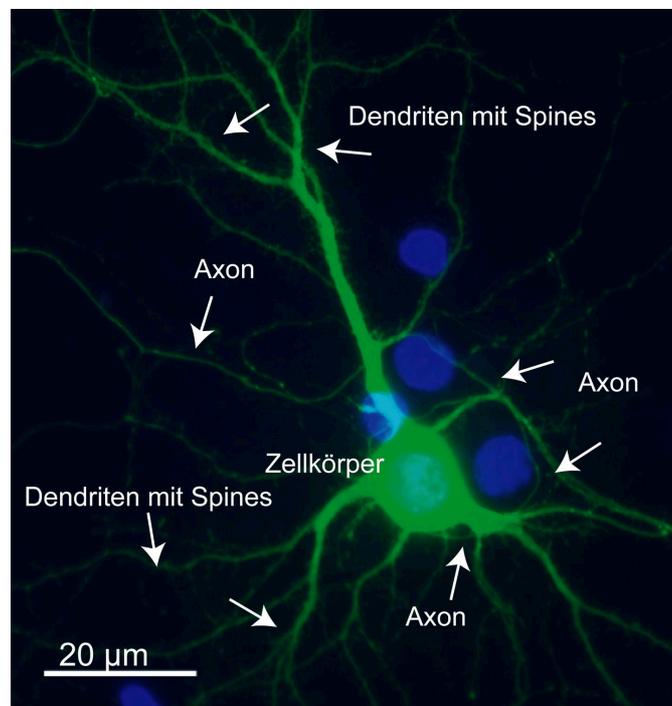
### **1.3 Das Neuron**

Neurone (Nervenzellen) bilden zusammen mit den Gliazellen das Nervensystem. Die wichtigste Aufgabe der Nervenzellen ist die Informationsweiterleitung und -verarbeitung. Für diese Aufgaben sind sie mit besonderen Eigenschaften ausgestattet. Neben einer Plasmamembran, die eine elektrische Erregbarkeit und die Weiterleitung von elektrischen Signalen zulässt, bilden sie spezielle Kontaktstellen zur Weitergabe der Signale untereinander aus. An diesen Kontaktstellen, den Synapsen, wandeln sie das ankommende elektrische Signal in ein chemisches um. Eine besondere Eigenschaft der Nervenzellen liegt in ihrer Fähigkeit, je nach Aktivität in ihren Übertragungseigenschaften gestärkt oder geschwächt zu werden (synaptische Plastizität). Diese Eigenschaft verleiht den Nervenzellen die Möglichkeit, Informationen zu verarbeiten und abzuspeichern (Squire, 1992).

#### **1.3.1 Aufbau einer Nervenzelle**

Eine Nervenzelle lässt sich, wie in Abbildung 1-5 dargestellt, in drei Bereiche gliedern: den Zellkörper (Perikaryon), die Dendriten und das Axon. Die Dendriten und das Perikaryon dienen der Erregungsaufnahme, wohingegen das Axon der Erregungsweiterleitung dient. Das Perikaryon enthält den Zellkern sowie alle für das Überleben der Zelle notwendigen Zellorganellen. Ein Axon verlässt am Axonhügel den Zellkörper und bildet einen bis zu 1 m langen, dünnen Fortsatz. Das Axon ist für die Weiterleitung und Abgabe der im Axonhügel entstandenen Aktionspotenziale verantwortlich. Es kann sich in mehrere Seitenäste (Axonkollateralen) aufteilen und bildet an den Enden interzelluläre Kontaktstellen mit den Dendriten anderer Nervenzellen aus: die Synapsen. Im Gegensatz zu einem Axon, entspringen dem Zellkörper viele Dendriten. Die Fähigkeit der lokalen Proteinsynthese ermöglicht den Dendriten eine aktivitätsabhängige Translation benötigter Proteine an den Synapsen,

weit entfernt vom Soma. Die Ausbildung eines stark verzweigten Dendritenbaums ermöglicht eine weitreichende Vernetzung. Für viele Erkrankungen, die mit einer mentalen Retardierung einhergehen, konnten Veränderungen des Dendritenbaums gezeigt werden. Bei Kindern mit Down-Syndrom oder bei Patienten mit Rett-Syndrom konnte in verschiedenen Cortexarealen eine deutlich reduzierte Dendritenverzweigung gezeigt werden (Becker et al., 1986, Armstrong et al., 1995). Entlang der Dendriten von Pyramidenzellen befinden sich Membranausstülpungen („Dornen“, Spines), die mit den Endköpfchen der Axone (Boutons) Synapsen ausbilden. Axon und Dendriten werden durch das Zytoskelett stabilisiert.



**Abbildung 1-5: Hippocampale Nervenzelle**

Die Abbildung zeigt eine GFP-markierte, hippocampale Nervenzelle. In blau sind die Zellkerne zu sehen. Das Neuron unterteilt sich in den Zellkörper, sowie die Spines-besetzten Dendriten und ein langes, dünnes Axon.

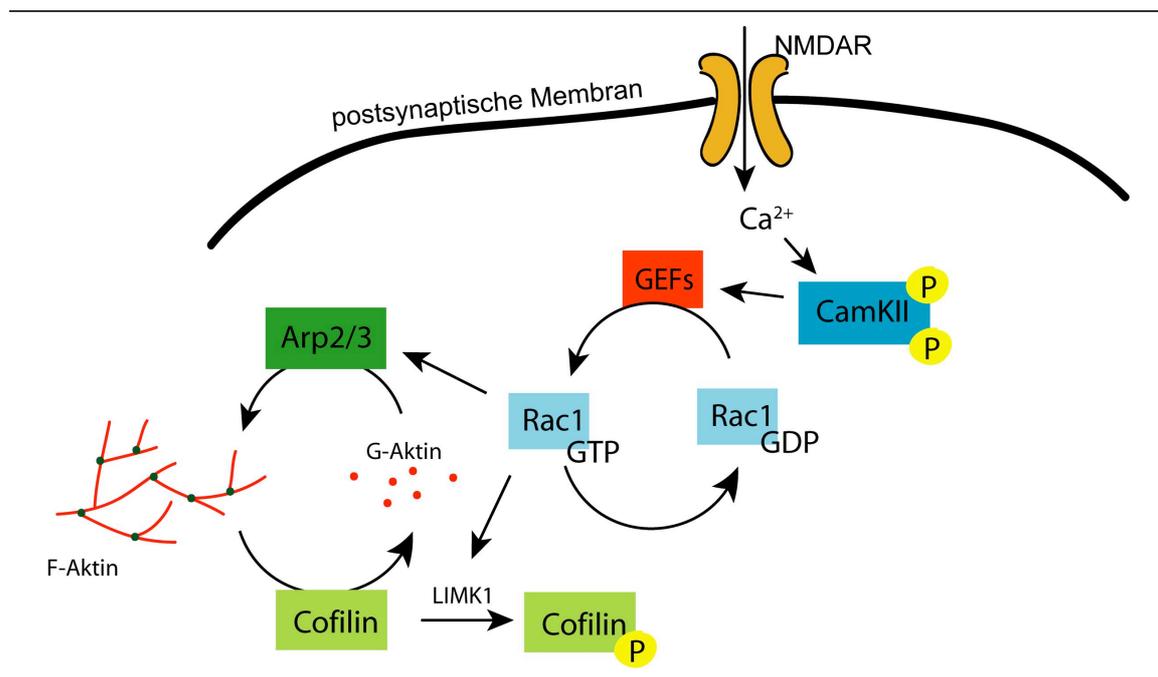
### 1.3.2 Aufbau und Regulation des Zytoskeletts

Am Aufbau des dynamischen Zytoskeletts sind drei unterschiedliche Filamente beteiligt: Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli. Diese Proteinstrukturen befinden sich in einem kontinuierlichen Auf- und Abbauprozess, der die Dynamik des Zytoskeletts widerspiegelt. Mikrotubuli stellen dabei die stabilsten

## Einleitung

Elemente dar, während die Intermediärfilamente die flexibelsten sind. Durch die reversible Anlagerung von Monomeren sind die Aktinfilamente an der Zellbewegung und dem intrazellulären Transport beteiligt (Street and Bryan, 2011). Sie sind zudem für die Ausbildung des Spinezytoskeletts verantwortlich. Für die dynamische Reorganisation der Aktinfilamente ist das Protein Cofilin zuständig, welches durch LIM Kinasen phosphoryliert und somit inaktiviert wird (Meng et al., 2002).

Ein Protein, welches ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des Aktinzytoskeletts einnimmt, ist die  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CaMKII). Das Enzym ist aus sechs Untereinheiten aufgebaut und in der Lage, sich durch Autophosphorylierung selbst zu aktivieren. Das Enzym nimmt auf unterschiedlichen Wegen Einfluss auf die Ausbildung von Aktinfilamenten. Als Signaltransduktionsmolekül kann es den Umbau des Zytoskeletts auslösen. In der Postsynapse ist das Enzym damit an der Ausbildung der Langzeitpotenzierung beteiligt. Durch die synaptische Aktivität wird das Enzym phosphoryliert und dadurch aktiviert.



**Abbildung 1-6: CaMKII-Rac1-vermittelter Signalweg zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts**

Schema des CaMKII-Rac1-vermittelten Signalwegs, der zum Aufbau und Umbau des Aktinzytoskeletts führt. Kalziumeinstrom durch NMDA-Rezeptoren in die Zelle aktiviert das Enzym CaMKII. Über die daraus folgende Aktivierung verschiedener GEFs kommt es zur Aktivierung der GTPase Rac1. Diese führt über das Protein Arp2/3 oder die LIMK1 zur Aktivierung oder Hemmung des Proteins Cofilin und somit zum Umbau von F-Aktin.

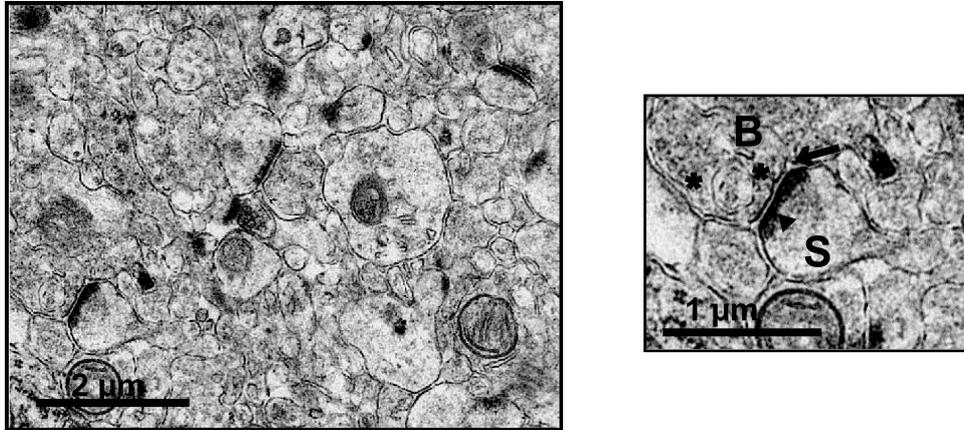
Wie dem Schema aus Abbildung 1-6 zu entnehmen ist, spielt auch die GTPase Rac1 eine wichtige Rolle. Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) gehört zur großen Proteinfamilie der Rho-GTPasen. GTPasen sind kleine G-Proteine (Guaninnucleotid-bindendes Protein), welche durch ihre Fähigkeit alternierend GTP (aktiv) oder GDP (inaktiv) zu binden, eine Schlüsselrolle in vielen Signalkaskaden einnehmen (Jaffe and Hall, 2005). Neben ihrem Einfluss an der Regulation des Zytoskeletts, sind sie auch an der Regulation der Genexpression beteiligt (Tzima et al., 2002). Die Aktivierung der GTPasen erfolgt mit Hilfe sogenannter Guanin-Austauschfaktoren (englisch: guanine nucleotide exchange factors (GEFs)). Rac1 trägt durch seinen Einfluss auf das Protein Cofilin zur Ausbildung des Aktin-Netzwerks bei. Aktiviertes Rac1 führt zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der LIMK1, welche in der Folge das Protein Cofilin phosphoryliert. Dies führt zur Stabilisierung des Zytoskeletts, da die Inaktivierung von Cofilin einen reduzierten Umbau von Aktinmonomeren bedingt (DesMarais et al., 2004, Jaffe and Hall, 2005).

### 1.3.3 Synaptische Übertragung

Über hochspezialisierte Kontaktstellen (Synapsen) kann das Signal von einem Neuron auf das Nächste übertragen werden. Bei den synaptischen Kontaktstellen im Hippocampus handelt es sich um chemische Synapsen. An diesen findet die Reizweiterleitung durch Umwandlung des elektrischen Signals in ein chemisches Signal statt. Abbildung 1-7 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Synapsen im Hippocampus, sowie die detaillierte Darstellung einer einzelnen Synapse. Die Axonterminalen einer Nervenzelle bilden den präsynaptischen Teil der Synapse (Bouton). Aus den Boutons werden durch das ankommende elektrische Signal die in Vesikeln befindlichen Neurotransmitter in den 20-40 nm breiten synaptischen Spalt ausgeschüttet (Purves et al., 2012). Die Neurotransmitter diffundieren zur Kontaktstelle des nachgeschalteten Neurons, den Spine, welcher den postsynaptischen Teil der Synapse bildet. Dort lösen sie, über die Bindung an verschiedene Rezeptoren, einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle aus. An der Ausschüttung der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt sind verschiedene Proteine beteiligt. Eine wichtige Rolle spielen die Proteine Synaptobrevin und Snap-25, die mit dem Protein Syntaxin-1 den sogenannten SNARE-Komplex bilden. Dieser Komplex bewirkt die Verschmelzung der Vesikel mit der Membran und die daraus resultierende Neurotransmitterfreisetzung. Das Protein

## Einleitung

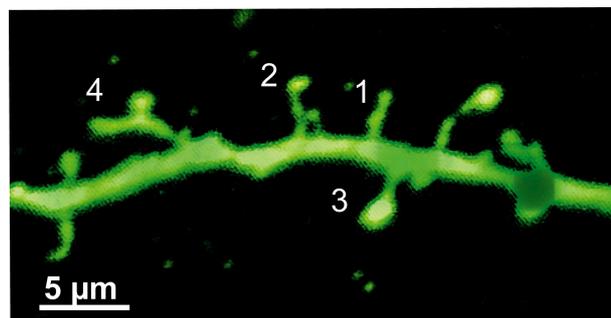
Synaptophysin interagiert in der Folge mit dem Protein Synaptobrevin, was zu einem Recycling von Synaptobrevin mit dem erneuten Einbau in die Vesikelmembran führt (Gordon et al., 2011).



**Abbildung 1-7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus der CA1 Region**

Im linken Bild ist eine elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme aus der CA1 Region adulter WT Tiere zu sehen. Auf der rechten Seite ist die Vergrößerung einer Spinesynapse abgebildet. Zu erkennen ist der präsynaptische Bouton (B) mit den Neurotransmitter-gefüllten Vesikeln (\*). Zwischen der prä- und postsynaptischen Seite, dem Spine (S) erkennt man deutlich den synaptischen Spalt (→). Als elektronendichte Platte in schwarz ist die postsynaptische Dichte (▲) zu erkennen.

Spines dienen der Oberflächenvergrößerung und dadurch einer gesteigerten Transmission (Nimchinsky et al., 2002). Es sind sehr mobile Strukturen, die ihre Form ständig verändern (Bonhoeffer and Yuste, 2002). Abbildung 1-8 zeigt Beispiele für die verschiedenen Kategorien, in die Spines abhängig von Morphologie und Funktion eingeteilt werden können.



**Abbildung 1-8: Überblick der Spinekategorien**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Dendriten mit Spines. Die Aufnahme zeigt exemplarisch die unterschiedliche Morphologie der Spines, nach der sie in die unterschiedlichen Kategorien eingeteilt werden können. 1 zeigt ein Filopodium, 2 einen immaturren Spine, 3 einen maturated Gedächtnisspine und 4 einen perforierten Spine.

Zuerst entwickeln sich als Dendritenvorläufer die Filopodia (Trommald and Hulleberg, 1997, Sorra et al., 1998, Zuo et al., 2005). Aus diesen entwickeln sich anschließend die ‚thin‘ Spines. Diese besitzen eine kleine postsynaptische Dichte, sind frei von AMPA Rezeptoren und gelten als unreif bzw. immatur. Sie sind zudem anfällig für Abbauprozesse. Die reife bzw. mature Form, bilden die ‚mushroom‘ Spines, auch als Gedächtnisspines (memory spines) bezeichnet. Sie besitzen eine starke postsynaptische Dichte mit eingebauten AMPA Rezeptoren, sind sehr stabil und können Tage bis Jahre bestehen bleiben. Sie enthalten zudem einen eigenen Kalziumspeicher, den sogenannten Spineapparat (Deller et al., 2003). Dieser ermöglicht eine  $Ca^{2+}$ -induzierte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Freisetzung, und dadurch eine gesteigerte Erregung. Eine noch relativ unbekannt Kategorie bilden die ‚branched‘ Spines. Man vermutet, dass die Perforation des Spines zu einer Verbesserung der synaptischen Übertragung führen soll (Harris et al., 2003).

Veränderungen dieser Strukturen sind für Erkrankungen wie das Down-Syndrom oder Trisomie 13 gezeigt worden (Marin-Padilla, 1972). Dabei kann es sowohl zu einer Zunahme, einer reduzierten Anzahl oder zu Veränderungen in der Morphologie der Spines kommen. Stabilisiert werden Spines durch ein intaktes Aktinzytoskelett. Eine Reihe postsynaptischer Proteine trägt ebenfalls zum Ausbau und damit zur Stabilisierung bei. Eine wichtige Rolle spielt dabei das Aktin-assoziierte Protein Spinophilin, sowie das mit dem Spineapparat assoziierte Protein Synaptopodin.

Während der frühen postnatalen Entwicklung kommt es zu einer gesteigerten Anzahl an Synapsen im Hippocampus. Durch Entwicklungs- und Lernprozesse werden in der weiteren Entwicklung überflüssige Synapsen eliminiert. Diesen physiologischen Rückgang an Synapsen nennt man synaptisches Pruning (Huttenlocher, 1990, Zuo et al., 2005).

#### **1.4 Mikroglia und synaptisches Pruning**

Mikroglia gehören zur großen Gruppe der Gliazellen, die neben den Neuronen im Nervengewebe und damit im Hippocampus zu finden sind. Sie leiten sich von Makrophagen ab und besitzen demnach im Gegensatz zu den ektodermal entstandenen restlichen Gliazellen einen mesodermalen Ursprung. In der frühen Entwicklung des Nervensystems wandern sie aus dem Knochenmark in das sich entwickelnde Gehirn. Durch ihren mononukleären Ursprung sind sie für die Aufnahme und Verdauung

## Einleitung

entzündeter, apoptotischer Zellbestandteile und Zellen, sowie nicht benötigter Gewebeteile, zuständig (Mallat et al., 2005, Ajami et al., 2007). Mikroglia und ihre genaue Funktion im gesunden Hirn sind in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt. So konnte ihr Einfluss am synaptischen Pruning von unterschiedlichen Arbeitsgruppen beschrieben werden (Wake et al., 2009, Miyamoto et al., 2013, Zhan et al., 2014).

Eine Studie konnte zeigen, dass durch den Verlust der Mikrogliaaktivität die Entwicklung der synaptischen Verschaltung im Hippocampus verzögert wird (Paolicelli et al., 2011). Der Verlust der Mikrogliaaktivität ist auf das Fehlen des Chemokinrezeptors CXCR3 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3) zurückzuführen, welcher hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems zu finden ist (Harrison et al., 1998). Während der Synaptogenese produzieren Neurone den natürlichen CXCR3 Liganden, das Chemokin Fraktalkine, welches essenziell für die Migration der Mikroglia ist (Liang et al., 2011). Durch das Fehlen des Rezeptors kommt es zu einer nicht ausreichenden Phagozytose, das synaptische Pruning wird verzögert. Mikroglia treten aktivitätsabhängig kurz (5 Minuten) und periodisch (1/Stunde) in Kontakt mit den Synapsen. Reduziert man die neuronale Aktivität, reduziert sich auch die Frequenz der Kontaktaufnahme (Miyamoto et al., 2013).

Die Aktivierung von Mikroglia und damit verbundene Phagozytose nicht benötigter Synapsen scheint allerdings nicht nur aktivitätsabhängig zu sein, sondern auch komplementabhängig (Schafer et al., 2012). Das Komplementsystem ist zuständig für die Markierung von Oberflächen für die Phagozytose. Der Komplementfaktor C3 spielt dabei eine wichtige Rolle. In der Zelle befindet sich C3 in Mikrovesikeln, den Exosomen, welche aktivitätsabhängig durch Endozytose freigesetzt werden und immature, nicht benötigte Synapsen für die Phagozytose markieren (Bahrini et al., 2015). Durch das Fehlen des Komplementfaktors kommt es ebenfalls zu einer reduzierten Synapseneliminierung (Stevens et al., 2007, Stephan et al., 2012).

## 1.5 Derzeitiger Wissensstand: Mentale Retardierung in PKU

In der Literatur werden verschiedene Pathomechanismen, die zur Ausbildung der mentalen Retardierung bei PKU führen, diskutiert. Grundsätzlich findet man Untersuchungen an Patienten, *in-vivo* Untersuchungen in der von Shedlovsky et al. etablierten *Pah<sup>enu2</sup>* Maus (Shedlovsky et al., 1993) oder aber *in-vitro* Untersuchungen in verschiedenen Zellkultursystemen. Die von Shedlovsky et al. publizierte *Pah<sup>enu2</sup>* Maus ist ein etabliertes Modell zur Erforschung der humanen Erkrankung PKU. Durch Keimbahnmutation mittels Ethylnitrosoharnstoff (ENU) wurde das *PAH* Gen in der Maus verändert. Durch die daraus resultierende inaktive Form des Enzyms kommt es zu mit der humanen Erkrankung vergleichbar erhöhten Phe-Werte in Plasma und Liquor (McDonald et al., 1990).

Die Untersuchungsschwerpunkte liegen auf 1) Veränderungen der weißen Substanz durch Myelinisierungsstörungen, 2) Auswirkungen erhöhter Phe-Spiegel auf die Neurotransmitter im Hirn sowie 3) Veränderungen des neuronalen Wachstums und der damit verbundenen synaptischen Plastizität.

### 1) Veränderungen der weißen Substanz durch Myelinisierungsstörungen

Postmortem Studien an PKU Patienten zeigen eine selektive Abschwächung der Myelinfärbung. Betroffen sind die Strukturen, die postnatalen Myelinisierungsprozessen unterliegen, wie die Assoziationsfasern des Neocortex (Bauman and Kemper, 1982). Untersuchungen in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus konnten die Hypomyelinisierung der Assoziationsfasern des Neocortex, sowie des Cerebellums und des Hirnstamms bestätigen (Dyer et al., 1996). *In-vitro* Untersuchungen an Oligodendrozyten nach Phe-Behandlung, zeigten zudem einen Anstieg an nicht-myelinisierenden Oligodendrozyten (Dyer et al., 1996). Interessanterweise konnte in jungen Ratten ein Rückgang der Hypomyelinisierung nach Absetzen der erhöhten Phe-Zufuhr und einer Erholungszeit von vier Wochen nachgewiesen werden. Der Einfluss erhöhter Phe-Dosen auf die Myelinisierung ist somit teilweise ein reversibler Vorgang (Reynolds et al., 1992).

### 2) Auswirkungen erhöhter Phenylalaninspiegel auf die Neurotransmitter im Hirn

Durch den Mangel an Tyrosin kommt es zu einer reduzierten Synthese wichtiger Neurotransmitter. Untersuchungen in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus zeigten eine signifikante Reduktion der Neurotransmitter Serotonin, Noradrenalin und Dopamin in verschiedenen

Hirnarealen (Puglisi-Allegra et al., 2000, Pascucci et al., 2002). Überraschenderweise zeigten Urintests bei Patienten mit erhöhten Phe-Spiegeln, dass es trotz der zusätzlichen Gabe von Tyrosin nicht zu einer gesteigerten Synthese der Katecholamine kommt (Curtius et al., 1972a, Curtius et al., 1972b). Ursache hierfür kann möglicherweise die *in-vitro* beschriebene Hemmung des Enzyms Tyrosinhydroxylase durch Phe-Konzentrationen ab  $2 \times 10^{-3}$  mol/l sein (Ikeda et al., 1967).

Zusätzlich zu der verminderten Tyrosinsynthese, bedingt durch den Mangel des Enzyms PAH und die zusätzliche Hemmung des Enzyms Tyrosinhydroxylase durch erhöhte Phe-Spiegel, kommt es zu einem bevorzugten Transport der Aminosäure über die Blut-Hirn-Schranke durch den L-Typ Aminosäuretransporter. Der Transporter besitzt die höchste Affinität zu Phe, was den Transport der anderen großen neutralen Aminosäuren, wie z. Bsp. Tyrosin, Tryptophan oder Leucin (englisch: LNAA – large neutral amino acids) durch die erhöhten Phe-Konzentrationen zusätzlich einschränkt (Knudsen et al., 1995, Pietz et al., 1999). Durch die Supplementierung von LNAAs konnte der gesteigerte Phe Transport in PKU Patienten gehemmt werden (Pietz et al., 1999).

### **3) Veränderungen des neuronalen Wachstums und der damit verbundenen synaptischen Plastizität**

Es gibt eine Vielzahl an Studien zu den Auswirkungen erhöhter Phe-Werte auf die Entwicklung kortikaler Neurone im Tiermodell (Cordero et al., 1983, Lacey, 1984, Horster et al., 2006). Intraperitoneale Phe-Injektionen in neugeborenen Ratten führen zu einer gestörten Ausbildung kortikaler Neurone (Cordero et al., 1983) sowie zu einem Spineverlust (Lacey, 1984). In kortikalen Neuronenkulturen von Mäusen führt Phe zu einer reduzierten Synaptogenese (Horster et al., 2006). Untersuchungen, die sich mit der Spine-Entwicklung im Cortex der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus beschäftigen, konnten eine reduzierte Anzahl an Spines im präfrontalen Cortex nachweisen (Andolina et al., 2011). Eine Reihe von Untersuchungen zeigt die Auswirkungen von Phe auf die glutamaterge Erregungsweiterleitung. So reduziert Phe in hippocampalen und kortikalen Neuronenkulturen die Reizweiterleitung (Glushakov et al., 2002, Glushakov et al., 2003, Glushakov et al., 2005, Andolina et al., 2011). Im Hippocampus 12 Wochen alter *Pah<sup>enu2</sup>* Mäuse haben wir eine reduzierte Langzeitpotenzierung und eine verringerte präsynaptische Neurotransmitterfreisetzung gezeigt (Horling and Schlegel et al., 2014). Dies war begleitet von einer erhöhten Anzahl an Synapsen in der CA1 und CA3 Region des Hippocampus (Horling and Schlegel et al., 2014).

## 1.6 Aufgabenstellung der Arbeit

In der Einleitung ist dargelegt worden, dass es sich bei der PKU um eine Erkrankung des Aminosäurestoffwechsels handelt, welche unbehandelt zur mentalen Retardierung führt. Trotz der Identifizierung des zugrunde liegenden Enzymdefekts und diverser Einzellstudien sind die Mechanismen, welche zur Entstehung der mentalen Retardierung führen, bis heute nicht aufgeklärt. Insbesondere die Frage, ob es sich um einen direkten Effekt der erhöhten Phe-Konzentration handelt, ist ungeklärt. Da der Hippocampus wesentlich an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt ist, wurde diese Region zur Beantwortung der Frage herangezogen. Vorausgegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben ein gestörtes synaptisches Pruning, eine erniedrigte Langzeitpotenzierung sowie veränderte prä- und postsynaptische Proteinmengen in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus nachgewiesen (Horling and Schlegel et al., 2014). Durch die Wahl eines *in-vitro* Modells konnte gezielt der Frage nach dem direkten Einfluss erhöhter Phe-Werte nachgegangen werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen untersucht:

### **Hat die Aminosäure Phenylalanin direkten Einfluss auf die Ausbildung des hippocampalen Netzwerks?**

Hypothese: Die Aminosäure Phenylalanin führt in erhöhten Konzentrationen zu einer gestörten Differenzierung hippocampaler Neurone und einer gestörten synaptischen Konnektivität.

Die Ausbildung des Dendritennetzwerks pyramidaler Neurone ist für die Verarbeitung und Weiterleitung von Informationen unerlässlich. Für den Austausch der Informationen von einem Neuron auf das Nächste sind zudem funktionsfähige Synapsen notwendig.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Phe auf die Differenzierung des Dendritenbaums und die Ausbildung von Spinesynapsen untersucht. Ebenso wurde der Einfluss von Phe auf die Expression prä- und postsynaptischer Proteine untersucht, welche für die Reizweiterleitung sowie die Ausbildung des Zytoskeletts notwendig sind.

**Welche Mechanismen liegen den morphologischen Veränderungen, ausgelöst durch Phenylalanin, zugrunde?**

Aufbauend auf den gefundenen morphologischen Veränderungen, wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht, über welche Mechanismen die erhöhten Konzentrationen Phe auf hippocampale Neuronen einwirken.

**Beeinflusst Phenylalanin die Ausbildung des Aktinzytoskeletts?**

Hypothese: Phenylalanin beeinflusst in erhöhten Konzentrationen die Stabilität des Zytoskeletts und führt dadurch zu einer veränderten Neuronenmorphologie.

Für die Reorganisation und Stabilisierung der Aktinfilamente ist das Protein Cofilin elementar (Bamburg, 1999). Veränderungen in der Cofilinmenge sowie dem Phosphorylierungsgrad nehmen Einfluss auf die Ausbildung des Aktingerüsts von Dendriten und deren Verzweigungen sowie der Spines.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Phe auf das Protein Cofilin und dessen Phosphorylierung untersucht.

**Beeinflusst Phenylalanin das Enzym CaMKII und die dadurch vermittelte Rac1 Aktivierung?**

Hypothese: Phenylalanin hat einen hemmenden Einfluss auf das Enzym CaMKII und die GTPase Rac1. Dies führt zu einer verminderten Reorganisation des Zytoskeletts und dadurch zu den strukturellen Veränderungen.

Das Enzym CaMKII ist neben seinem Einfluss auf das Zytoskelett ein wichtiger Botenstoff bei der Ausbildung der Langzeitpotenzierung und somit bei der Gedächtniskonsolidierung. Als Signaltransduktionsmolekül führt es zur Aktivierung der GTPase Rac1. Die GTPase nimmt Einfluss auf das Aktin-assoziierte Protein Cofilin und ist damit direkt am Aufbau und Umbau des Zytoskeletts beteiligt.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde zudem der Einfluss von Phe auf das Enzym CaMKII sowie die Aktivität der GTPase Rac1 untersucht.

### **Sind Mikroglia an den gefundenen Veränderungen beteiligt?**

Hypothese: Phenylalanin führt in erhöhten Konzentrationen zu einer reduzierten Aktivierung von Mikroglia, wodurch es zu einem verzögerten synaptischen Pruning kommt.

Durch ihren Einfluss am synaptischen Pruning sind Mikroglia in den letzten Jahren in den Fokus geraten. Nicht nur durch ihren Einfluss am Pruning, sondern auch durch ihre Beteiligung bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer oder der Amyotrophen Lateralsklerose (Gomez-Nicola and Perry, 2014). Unsere Arbeitsgruppe konnte ein verzögertes synaptisches Pruning im Hippocampus der *Pah<sup>emu2</sup>* Maus zeigen (Horling and Schlegel et al., 2014).

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Aktivität der Mikroglia in der *Pah<sup>emu2</sup>* Maus bestimmt, zum anderen wurde der direkte Einfluss der Aminosäure Phe auf die Aktivität der Mikroglia in hippocampalen Gewebekulturen untersucht.

## Ergebnisse

## 2 Ergebnisse

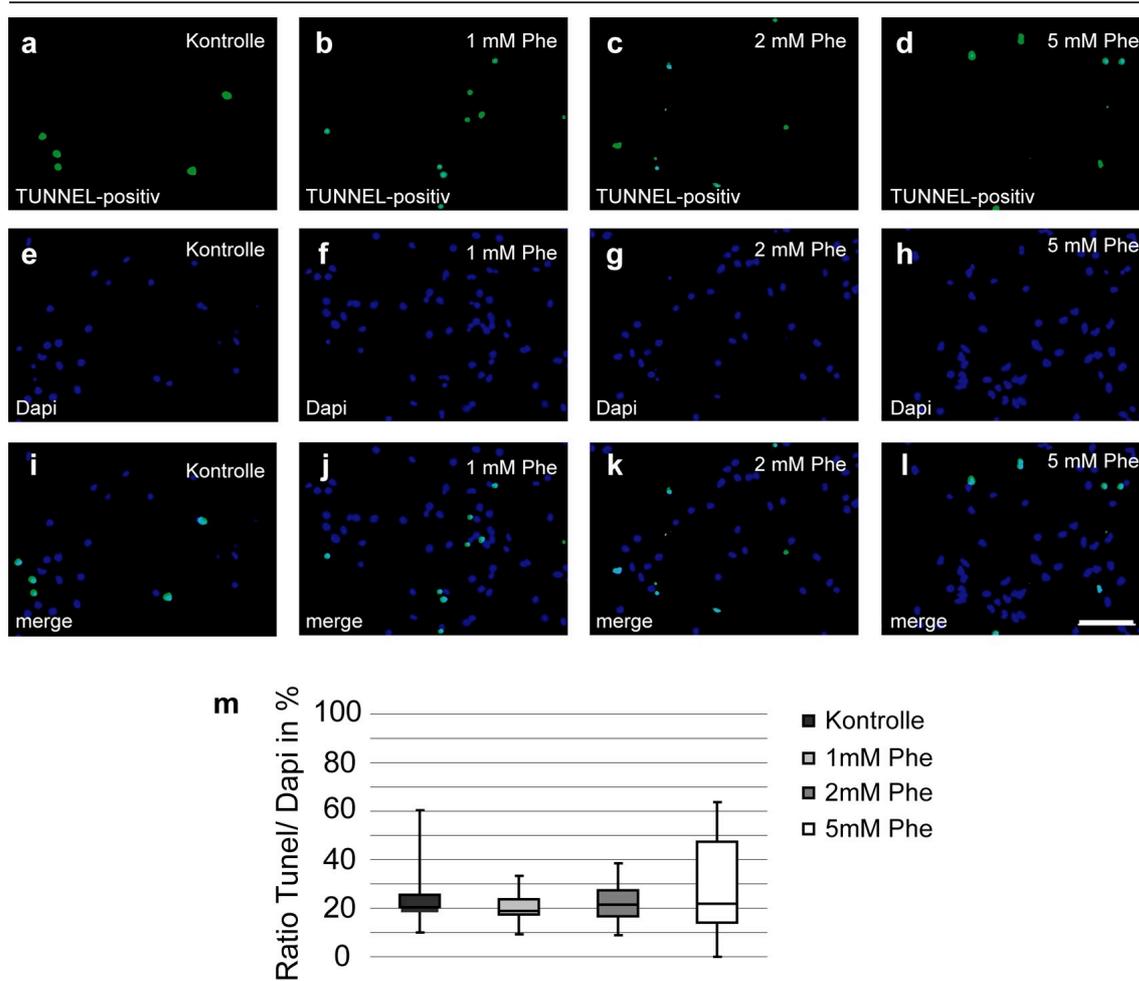
Mit Hilfe der hippocampalen Dispersionskultur als *in-vitro* Modell und dem dadurch bedingten Ausschluss weiterer Einflussfaktoren wurde im ersten Teil der Arbeit untersucht, welchen Einfluss verschiedene Konzentrationen der Aminosäure Phe auf das Wachstum und die Differenzierung hippocampaler Neurone besitzen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde geklärt, ob der CaMKII-Rac1-vermittelte Signalweg an den beobachteten Veränderungen beteiligt ist. Im dritten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Phe auf die Aktivität von Mikroglia untersucht.

### 2.1 Phenylalanin hat keinen Effekt auf die Vitalität hippocampaler Neurone

Die in dieser Arbeit verwendeten Phe-Konzentrationen betragen 1 mM, 2 mM und 5 mM. Zur Untersuchung einer potentiell erhöhten Apoptose durch erhöhte Phe-Konzentrationen wurde der TUNEL-Assay durchgeführt. Dabei werden DNA Einzel- und Doppelstrangbrüche markiert, welche als Indiz für die beginnende Apoptose dienen. Für die Auswertung wurden an fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen die TUNEL-positiven Zellen gezählt und die Gesamtzellzahl mittels DAPI-Kernfärbung bestimmt. Für die Quantifizierung des Apoptoseverhaltens wurde das Verhältnis von TUNEL-positiven Zellen zur Gesamtzellzahl gebildet.

Die Quantifizierung der Apoptoserate zeigte keinen Unterschied im Apoptoseverhalten hippocampaler Neurone nach Behandlung mit den ausgewählten Phe-Konzentrationen ( $F(3,15) = 0,277$ ,  $p = 0,841$ ). Unter Kontrollbedingungen kam es zu einer Apoptoserate von 24 %. Behandlung mit 1 mM Phe führte zu einer Apoptoserate von 22 % ( $p = 0,764$ ), Behandlung mit 2 mM Phe zu 23 % ( $p = 0,745$ ) und Behandlung mit 5 mM führte zu einer Apoptoserate von 33 % ( $p = 0,649$ ).

Phe hat in den gewählten Konzentrationen keinen apoptotischen Effekt auf die hippocampalen Neurone.



**Abbildung 2-1: TUNEL-Assay zur Evaluierung apoptotischer Effekte**

**a–l:** Fluoreszenzaufnahmen hippocampaler Dispersionskulturen unter Kontrollbedingungen (**a, e, i**), nach Behandlung mit 1 mM (**b, f, j**), 2 mM (**c, g, k**) oder 5 mM (**d, h, l**) Phe. **a–d:** Aufnahmen der TUNEL-positiven Kerne in grün. **e–h:** Kernfärbung mittels DAPI. **i–l:** Überlagerung der beiden Aufnahmen. Balken entspricht 20  $\mu$ m. **m:** Quantifizierung der apoptotischen Zellen, dargestellt in einem Boxplot.  $n = 3$  unabhängige Kulturen mit jeweils 100–150 Bilder pro Versuchsbedingung; Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

## 2.2 Phenylalanin beeinflusst *in-vitro* die Dendritogenese

Das korrekte Verzweigungsmuster hippocampaler Neurone ist für die Ausbildung eines funktionierenden Netzwerks eine wichtige Voraussetzung. Die Vernetzung ist für die Signalweiterleitung und -verarbeitung elementar (Wong and Ghosh, 2002). Für Krankheitsbilder wie das fragile X-Syndrom und das Down-Syndrom, welche ebenfalls zur Ausbildung einer mentalen Retardierung führen, konnte bereits eine veränderte Dendritenverzweigung für verschiedene Hirnstrukturen gezeigt werden (Takashima et al., 1981, Kaufmann and Moser, 2000). Für die Stoffwechselerkrankung PKU wurden

Untersuchungen des Neuronenwachstum und der Dendritenverzweigung bislang nur an Cortexneuronen durchgeführt (Horster et al., 2006). Daten für das Differenzierungsverhalten hippocamaler Neurone nach Phe-Behandlung liegen nicht vor. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob und wie sich erhöhte Phe-Konzentrationen auf die Differenzierung hippocampaler Neurone und auf die Entstehung des hippocampalen Netzwerks auswirken.

### **2.2.1 Charakterisierung des Dendritenbaums nach Phenylalaninbehandlung**

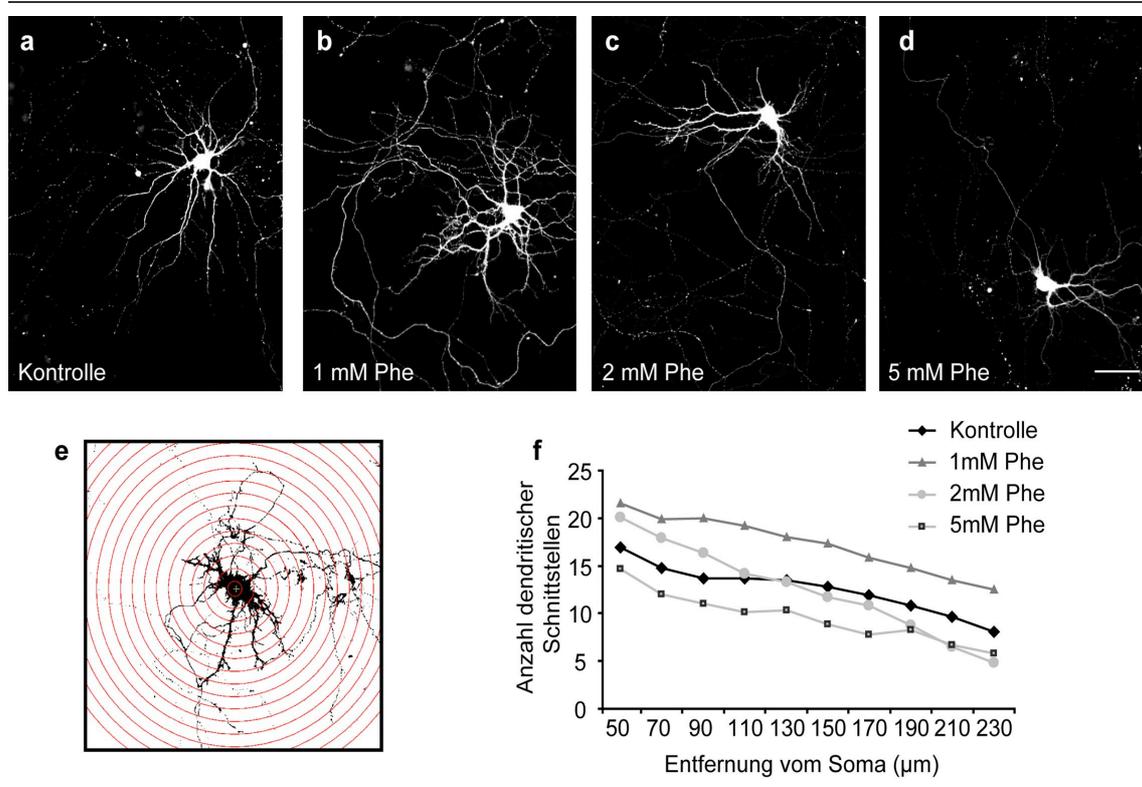
Um den Einfluss von Phe auf das Dendritenwachstum zu zeigen, wurden in dieser Arbeit hippocampale Dispersionskulturen mit Phe behandelt und die Dendritenverzweigung mit der Sholl-Analyse charakterisiert (Sholl, 1953). Die hippocampalen Kulturen wurden mit 1 mM, 2 mM oder 5 mM Phe behandelt. Durch Transfektion des grün fluoreszierenden Proteins (pEGFP) wurde das komplette Neuron sichtbar gemacht. Abbildungen der Neurone nach den unterschiedlichen Phe-Behandlungen sind in Abbildung 2-2 a-d dargestellt.

Die Behandlung hippocampaler Neurone mit Phe führte zu einem signifikanten Unterschied in der Dendritenverzweigung ( $F(3,80) = 18,236$ ,  $p < 0,001$ ). Die Behandlung mit 1 mM Phe über einen Zeitraum von sieben Tagen führte zu einem signifikanten Anstieg der Verzweigungen im Vergleich zur Verzweigung unter den Kontrollbedingungen ( $p < 0,001$ , Abbildung 2-2 b, f). Behandlung mit einer Phe-Konzentration von 2 mM zeigte, verglichen mit den Kontrollbedingungen, keinen Unterschied in der Verzweigung auf ( $p = 0,898$ , Abbildung 2-2 c, f). Interessanterweise zeigte eine Phe-Konzentration von 5 mM einen gegenteiligen Effekt. Die Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion der Dendritenverzweigungen im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,002$ ; Abbildung 2-2 d, f). Der paarweise Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander zeigte zudem einen signifikanten Unterschied zwischen den 1 mM Phe und 2 mM Phe behandelten ( $p < 0,001$ ), den 1 mM Phe und 5 mM Phe behandelten ( $p < 0,001$ ), sowie den 2 mM Phe und 5 mM Phe ( $p = 0,002$ ) behandelten hippocampalen Neuronen (Abbildung 2-2 f).

Phe hat einen dosisabhängigen Effekt auf die Dendritenverzweigung hippocampaler Neurone. Konzentrationen von 1 mM führen zu einer verstärkten

## Ergebnisse

Verzweigung, wohingegen stark erhöhte Konzentrationen (5 mM) zu einer reduzierten Verzweigung führen.



**Abbildung 2-2: Sholl-Analyse der Dendritenverzweigungen**

**a–d:** Die Bilder zeigen schwarz-weiß Abbildungen der pEGFP-transfizierten Neurone. **a:** ein Neuron unter Kontrollbedingungen. **b–d:** Aufnahmen Phe-behandelter Neurone (**b** = 1 mM, **c** = 2 mM und **d** = 5 mM Phe). Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$ . **e:** Neuron mit den für die Sholl-Analyse eingezeichneten konzentrischen Kreisen. **f:** Quantitative Auswertung der dendritischen Berührungspunkte (y-Achse) mit den im Radius zunehmenden konzentrischen Kreisen (x-Achse). Das Diagramm zeigt die Anzahl dendritischer Schnittstellen.  $N = 3$  unabhängige Kulturen und jeweils 80–120 Neurone pro Versuchsbedingung; Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

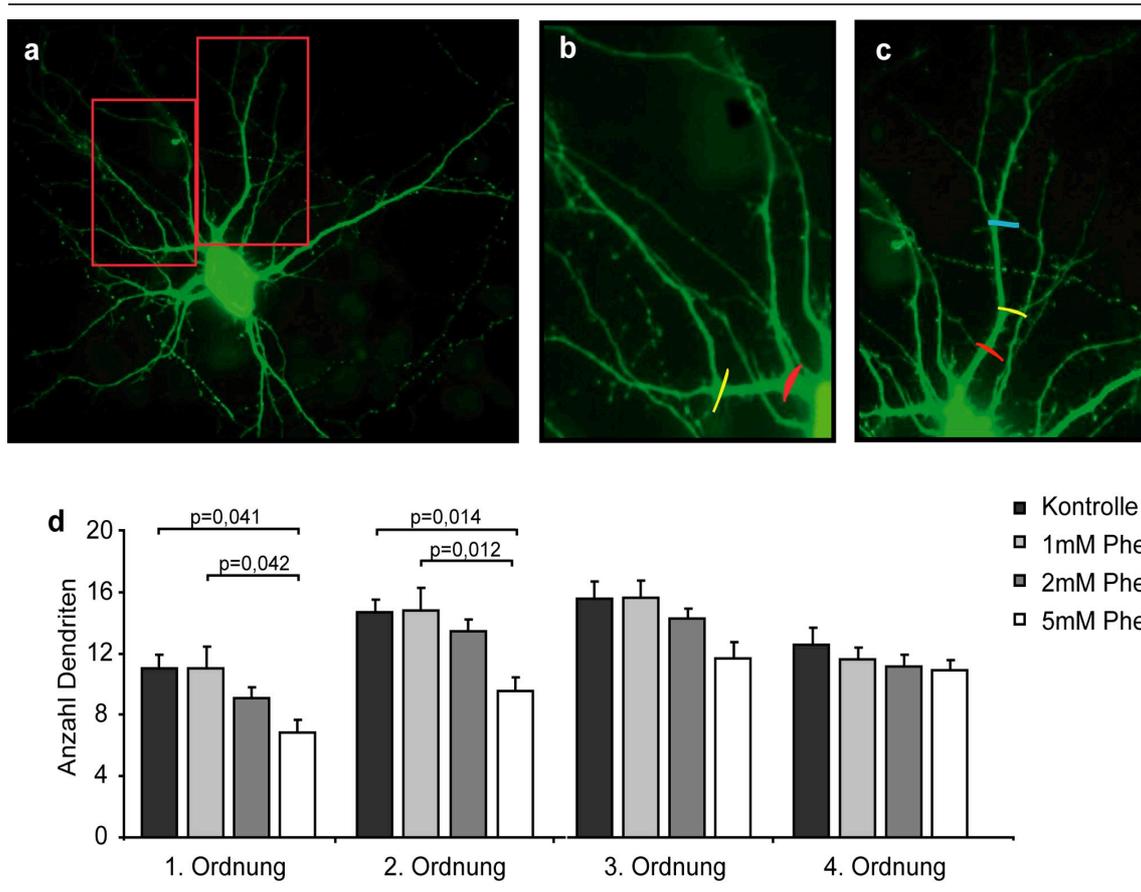
### 2.2.2 Charakterisierung des proximalen Dendritenbaums

Das Analyseverfahren nach Sholl liefert für die ersten 50  $\mu\text{m}$  vom Somamittelpunkt keine Daten. Zur Erfassung dieses proximalen Bereichs wurde ein gesondertes Untersuchungsverfahren gewählt. Bei jedem in die Auswertung einfließenden Neuron wurden die ersten Abgänge aus dem Soma als Dendriten erster Ordnung markiert (Primärdendriten). Durch das Weiterverfolgen dieser Dendriten wurden diese nach Teilung als Dendriten zweiter Ordnung markiert (Sekundärdendriten). Diesen Dendriten folgend erreicht man nach Teilung die Dendriten dritter und schließlich vierter Ordnung.

Für jedes Neuron wurde so der proximale Dendritenbaum quantifiziert (Abbildung 2-3 a-c).

Die Behandlung hippocampaler Neurone zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen auf ( $F(3,47) = 5,988$ ,  $p < 0,001$ ). Die Behandlung mit 5 mM Phe führte zu einer signifikant reduzierten Anzahl an Primärdendriten ( $p = 0,041$ ) und Sekundärdendriten ( $p = 0,014$ ) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (Abbildung 2-3 d). Für die Dendriten der 3. und 4. Ordnung konnte kein Unterschied festgestellt werden. Behandlung der Neurone mit 1 mM oder 2 mM Phe führt zu keinem Unterschied in der Anzahl an proximalen Dendriten im Vergleich zur Kontrolle. Vergleicht man die Phe-Behandlungen untereinander, führte die Behandlung mit 1 mM Phe zu signifikant mehr Dendriten der 1. und 2. Ordnung als die Behandlung mit 5 mM Phe ( $p = 0,007$ ).

Phe hat einen dosisabhängigen Effekt auf das Anlegen von Primär- und Sekundärdendriten. Hohe Dosen Phe führen nicht nur zu einer reduzierten Verzweigung im distalen Bereich, sondern sie führen auch zu einem reduzierten Anlegen von Dendriten aus dem Zellkörper. Mäßig erhöhte Dosen Phe hingegen (1 mM und 2 mM) haben keinen Einfluss auf das Anlegen von Primär- und Sekundärdendriten.



**Abbildung 2-3: Quantifizierung der proximalen Dendriten**

**a:** Abbildungen eines GFP-transfizierten Neurons nach Behandlung mit 1 mM Phe. Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ . **b+c:** Vergrößerungen des Neurons für die Bestimmung der Dendriten 1.-4. Ordnung. In rot ist die Teilung des Primärdendriten markiert. Die gelbe Markierung zeigt die Teilung des Sekundärdendriten in die Dendriten der 3. Ordnung. Die blaue Markierung (**c**) zeigt die Verzweigung in die Dendriten der 4. Ordnung. **d:** Quantitative Bestimmung der Dendritenanzahl pro Ordnung.  $n = 3$  unabhängige Kulturen und jeweils 30–60 Neurone pro Versuchsbedingung; Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p = 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

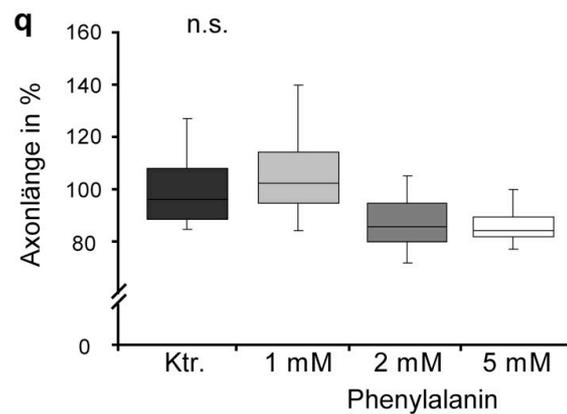
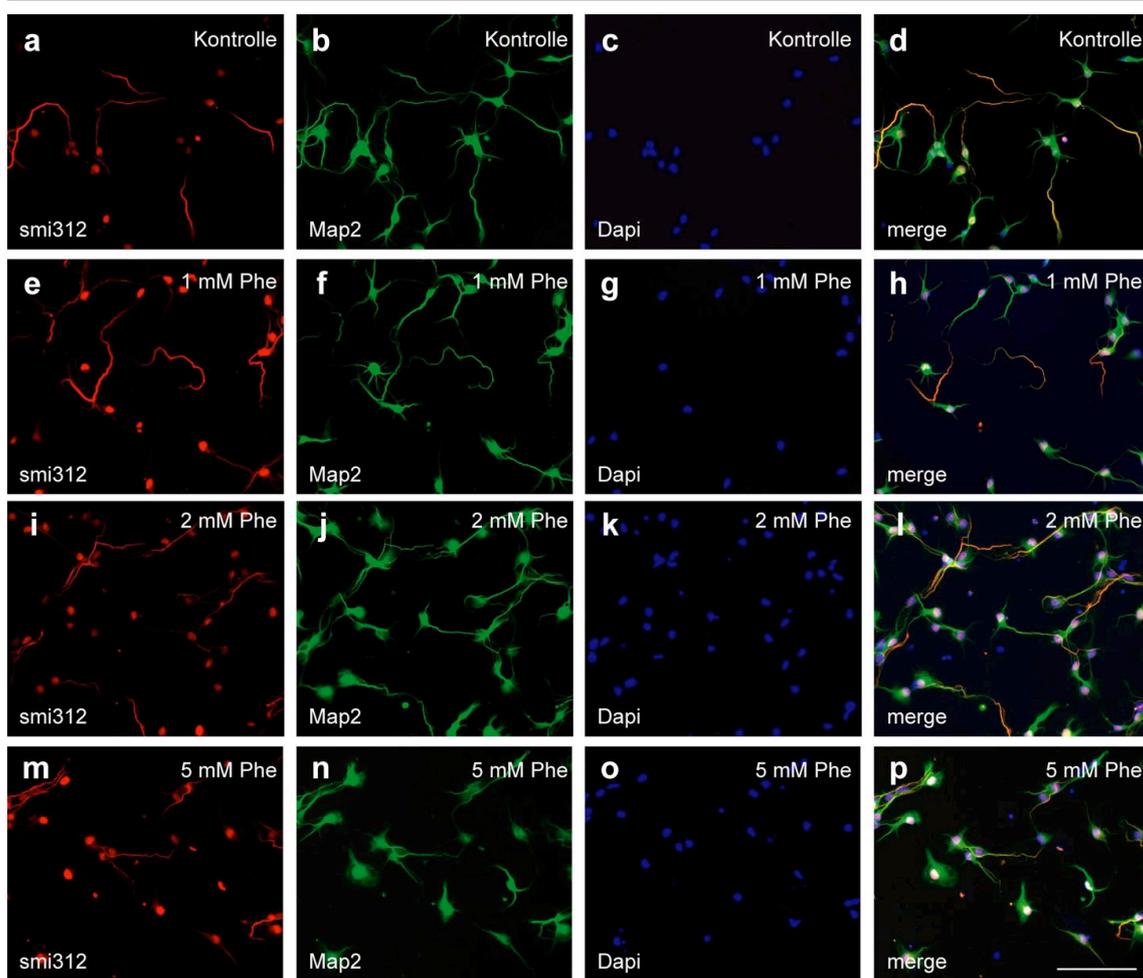
### 2.3 Einfluss von Phenylalanin auf das Axonwachstum

Das Axon eines Neurons ist für die Reizweiterleitung in Form von Aktionspotentialen essenziell. Aus diesem Grund ist die Entwicklung und Verzweigung des Axons elementar (Luo and O'Leary, 2005, Low and Cheng, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde das Axon mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers smi312 markiert. Der Antikörper richtet sich gegen phosphorylierte Neurofilamente, die ausschließlich im Axon lokalisiert sind (Ulfig et al., 1998). Die Komarkierung des Microtubulin-assoziierten Proteins 2 (MAP2), welches das gesamte Neuron markiert, zeigt neben dem Axon auch die Entwicklung der Dendriten. Um das Axonwachstum analysieren zu

können, wurden die Neurone für drei Tage mit Phe behandelt und anschließend mit den beiden Antikörpern komarkiert. Zu diesem Differenzierungszeitpunkt ist der Verzweigungsgrad der Axone für eine Quantifizierung noch zugänglich. Die Axonlängen wurden auf den mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bildern mit der Software ImageJ ausgemessen.

Die Abbildung 2-4 a-p zeigt Aufnahmen der markierten Neurone. Die quantitative Auswertung der Axonmessungen ergab keinen Unterschied in der Länge der Axone zwischen den Gruppen ( $F(3,11) = 1,560$ ,  $p = 0,273$ ). Die Behandlung mit 1 mM Phe führte tendenziell zu einer Steigerung der Axonlänge um 20 % ( $p = 0,648$ ), die Behandlung mit 2 mM führte wie auch die Behandlung mit 5 mM zu keinem messbaren Unterschied der Axonlängen ( $p = 0,29$  bzw.  $0,211$ ).

Phe hat keinen Einfluss auf das Wachstum von Axonen nach einer Differenzierungszeit von 3 Tagen.



**Abbildung 2-4: Axonwachstum nach Phenylalaninbehandlung**

**a–p:** Fluoreszenzaufnahmen der hippocampalen Neurone an DIV3. **a, e, i, m** zeigen die smi312, **b, f, j, n** die MAP2 Markierung. **c, g, k, o** zeigen die DAPI markierten Kerne. **d, h, l, p** zeigen die Überlagerungen der Aufnahmen. **a–d** zeigt das Axonwachstum unter Kontrollbedingungen, **e–h** nach Behandlung mit 1mM, **i–l** nach 2 mM Phe und **m–p** nach 5 mM Phe. Balken entspricht 100  $\mu$ m. **q:** Quantitative Auswertung der gemessenen Axonlängen in Prozent, dargestellt als Boxplot. n = 3 unabhängige Kulturen und jeweils 90–110 Bilder; Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc test.

## 2.4 Beeinflussung der synaptischen Konnektivität durch Phenylalanin

Während der Ausbildung der synaptischen Plastizität kommt es neben der Stärkung der benötigten Synapsen zur Eliminierung der Überflüssigen (Lichtman and Colman, 2000, Purves et al., 2012). Dieser, als synaptisches Pruning bezeichnete, physiologische Vorgang ist in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus gestört (Horling and Schlegel et al., 2014). Für das synaptische Pruning sind Mikroglia, die aktivitäts- und/oder komplementabhängig aktiviert werden, notwendig (Paolicelli et al., 2011, Schafer et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Frage untersucht, ob das verzögerte Pruning in direktem Zusammenhang mit den erhöhten Phe-Werten steht. Zur Beantwortung dieser Frage wurden verschiedene Aspekte untersucht. Zum einen wurde die Anzahl an Synapsen in organotypischen Gewebekulturen nach Behandlung mit erhöhten Konzentrationen Phe bestimmt. Ein zweiter Ansatz lag in der Quantifizierung und Klassifizierung dendritischer Spines und der Quantifizierung einiger prä- und postsynaptischer Proteine in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit Phe.

### 2.4.1 Phenylalanin beeinflusst direkt die Entwicklung von Spinesynapsen

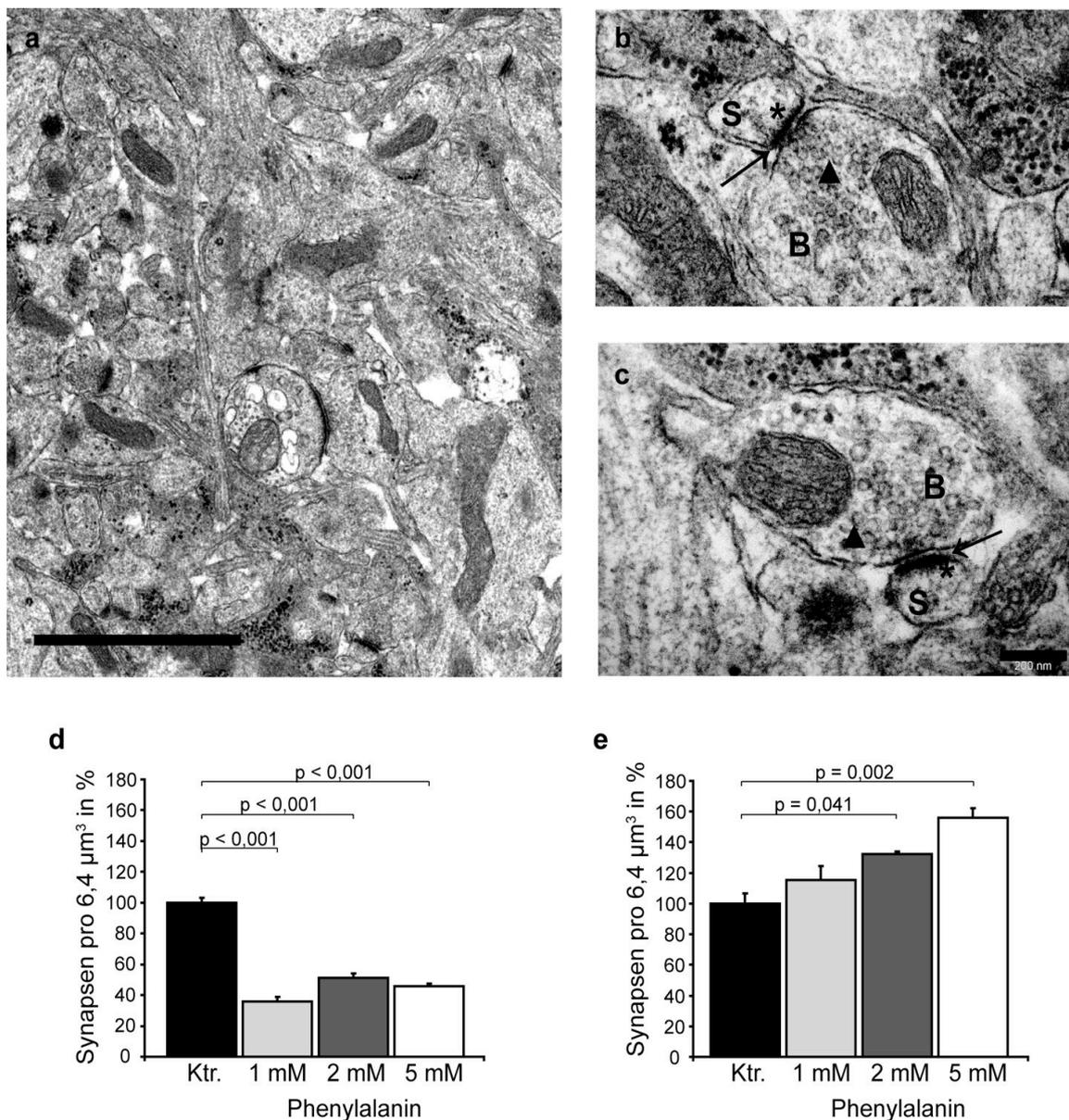
Um den Einfluss von Phe auf die Ausbildung von Spinesynapsen im Gewebeverband zu quantifizieren, wurden organotypische Gewebekulturen verwendet. In den Kulturen bleiben die neuronalen Verbindungen bestehen und während einer Kulturzeit von 21 Tagen kommt es zur vollständigen Synaptogenese in der CA1 und CA3 Region des Hippocampus (de Lima et al., 1997). Nach einer Adaptionszeit an die Kulturbedingungen wurden die Gewebekulturen mit den gewählten Phe-Konzentrationen behandelt.

Die stereologische Auszählung der Spinesynapsen (Sterio, 1984) zeigte einen regionsspezifischen Einfluss der Behandlung auf die Entwicklung von Spinesynapsen ( $F(3,59) = 13,818$ ,  $p < 0,001$ ). Die Behandlung mit Phe führte in der CA1 Region bei allen eingesetzten Konzentrationen zu einer signifikanten Abnahme an Spinesynapsen im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Behandlung mit 1 mM Phe reduzierte die Anzahl auf 36 %, Behandlung mit 2 mM reduzierte um die Hälfte auf 51 % und Behandlung mit 5 mM reduzierte auf 46 % (für alle  $p < 0,001$ ). In der CA3 Region hingegen, kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an Spinesynapsen nach Behandlung mit 2 mM und 5 mM Phe um 32 % bzw. 56 % ( $p = 0,041$  und  $p = 0,002$ ).

## Ergebnisse

Die Behandlung mit 1 mM Phe führte zu keiner Veränderung in der Anzahl verglichen mit Kontrollbedingungen ( $p = 0,315$ ).

Phe hat einen regionspezifischen Einfluss auf die Ausbildung der Spinesynapsen. Während Phe in der CA1 Region zu einer Reduktion an Spinesynapsen führt, kommt es in der CA3 Region zu einem dosisabhängigen Anstieg.



### Abbildung 2-5: Spinesynapsen in hippocampalen Gewebekulturen

**a–c:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus der CA1 Region unter Kontrollbedingungen. **a:** Ausschnitt einer Übersichtsaufnahme aus der CA1 Region. Balken entspricht 2 µm. **b+c:** Vergrößerungen einzelner Synapsen. Die Abbildungen zeigen die präsynaptische Axonendigung, den Bouton (B) und die darin enthaltenen Vesikel (▲). Zudem ist der synaptische Spalt (→) und die postsynaptische Dichte (\*) der Spines (S) zu erkennen. Balken entspricht 200 nm. **d–e:** Quantifizierung der Anzahl an Spinesynapsen in der CA1 (**d**) und der CA3 (**e**) Region in Prozent zur Kontrolle.  $n = 3$  unabhängige Kulturen und 3 Gewebeschnitte mit jeweils 8 Aufnahmen; Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

### 2.4.2 Phenylalanin beeinflusst die *in-vitro* Spinogenese

Um den Einfluss von Phe auf die Entwicklung des postsynaptischen Bereichs, der Spines, zu untersuchen, wurden hippocampale Dispersionskulturen nach einer Adaptionszeit von 3 Tagen für 11 Tage mit den gewählten Phe-Konzentrationen behandelt. Um die Spines sichtbar zu machen wurden die Neurone mit EGFP transfiziert und an fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen die Spines an den Dendriten quantifiziert. Spines sind sehr dynamische Strukturen und können anhand ihrer Morphologie charakterisiert werden. In einem zweiten Versuchsaufbau wurden die Spines anhand ihrer Morphologie in verschiedene Gruppen unterteilt (Tabelle 2-1, Abbildung 2-6, f).

<b>Filopodia</b>	<b>immature Spines</b>	<b>mature Spines</b>	<b>‚branched‘ Spines</b>
kein Kopf vorhanden	$\varnothing$ Kopf $< 0,8 \mu\text{m}$ ; Halslänge $\gg$ Kopfdurchmesser	$\varnothing$ Kopf $\geq 0,8 \mu\text{m}$ ; Halslänge $\ll$ Kopfdurchmesser	mehrere Köpfe; ein gemeinsamer Hals

**Tabelle 2-1: Gruppierung der Spines nach morphologischen Kriterien**

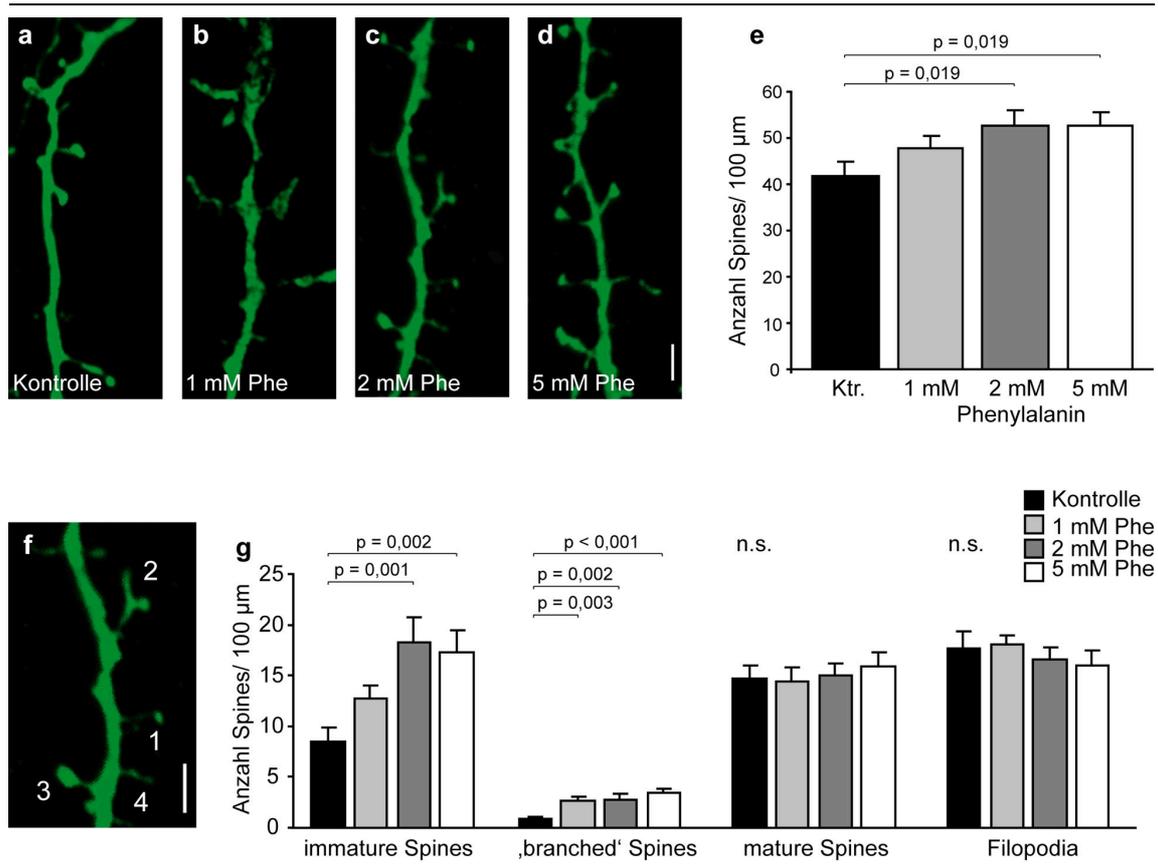
Wie in Abbildung 2-6 a-d dargestellt, beeinflusste Phe die Gesamtspineanzahl ( $F(3,25) = 2,955$ ;  $p = 0,055$ ). Die detaillierte Auswertung zeigte eine signifikante Zunahme an Spines nach Behandlung mit 2 mM und 5 mM Phe auf jeweils 126 % ( $p = 0,019$ , jeweils) verglichen mit den Kontrollbedingungen (Abbildung 2-6, e). Die Behandlung mit 1 mM Phe führte mit einer tendenziellen Steigerung auf 114 % ( $p = 0,156$ ) zu keinem signifikanten Unterschied in der Anzahl der Spines.

Die Quantifizierung der Spines nach ihren morphologischen Merkmalen (Tabelle 2-1) ist in Abbildung 2-6, g dargestellt. Phe führte in höheren Dosen (2 mM und 5 mM) zu einer Verdopplung und damit zu einem signifikanten Anstieg der immaturren Spines auf 216 % ( $p = 0,001$ ) und 204 % ( $p = 0,002$ ). Behandlung mit 1 mM Phe führte zu keiner Änderung in der Anzahl an immaturren Spines. In allen eingesetzten Konzentrationen führte Phe allerdings zu einem Anstieg der noch wenig charakterisierten ‚branched‘ Spines auf 1 mM: 292 % ( $p = 0,003$ ), 2 mM: 308 % ( $p = 0,002$ ) und 5 mM: 377 % ( $p <$

## Ergebnisse

0,001). Keinen Einfluss hingegen hatten die erhöhten Phe-Konzentrationen auf die Ausbildung der maturaen Spines und auf die Anzahl an Filopodia.

Phe steigert in höheren Konzentrationen (2 und 5 mM) die Bildung von Spines in hippocampalen Neuronen, insbesondere die Anzahl der immaturren Spines und der ‚branched‘ Spines. Konzentrationen von 1 mM hingegen beeinflussen die Ausbildung der Gesamtanzahl an Spines nicht.



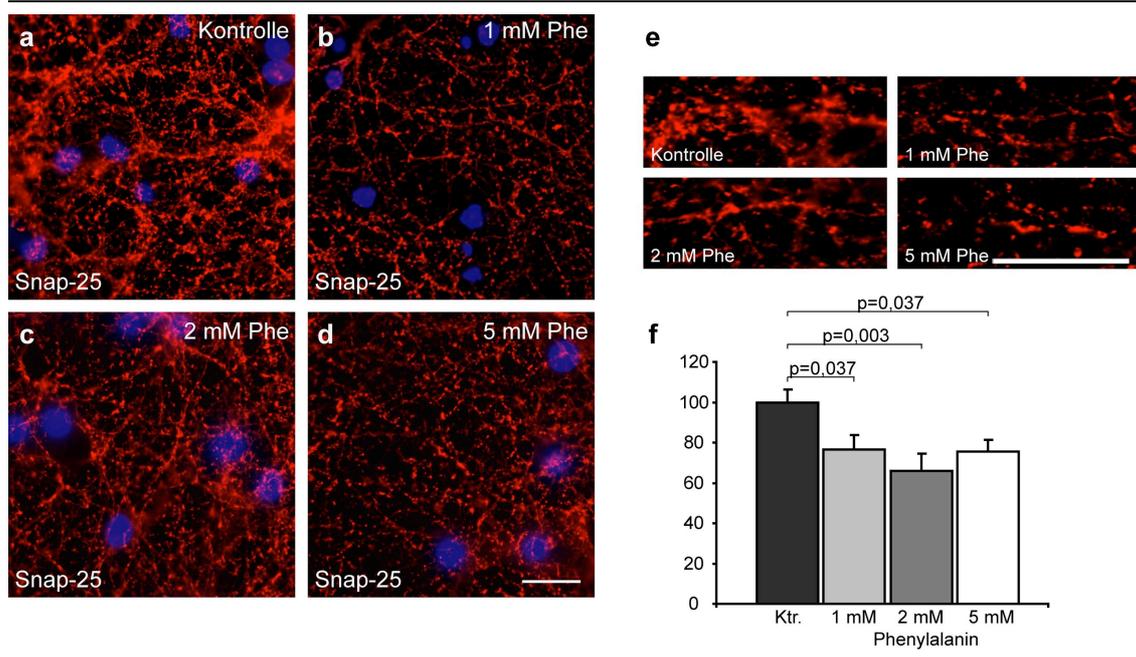
**Abbildung 2-6: Quantifizierung der Spines**

**a–d:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen GFP transfizierter Dendriten zur Darstellung der Spines. **a** zeigt eine Aufnahme unter Kontrollbedingungen, **b–d** zeigen Dendritenabschnitte der Phe behandelten Neurone (**b** = 1 mM, **c** = 2 mM, **d** = 5 mM). Balken entspricht 5  $\mu\text{m}$ . **e:** Quantifizierung der Spinedichte. **f:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zur Darstellung der unterschiedlichen Spinetypen. 1) immaturer Spine, 2) ‚branched‘ Spine, 3) maturaer Spine und 4) Filopodium. Balken 5  $\mu\text{m}$ . **g:** Quantifizierung der Spines nach den in Tabelle 2-1 aufgeführten Merkmalen.  $n = 3$  unabhängige Kulturen mit 100–140 Dendritenausschnitte pro Versuchsbedingung; Fehlerbalken zeigen Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

### 2.4.3 Phenylalanin beeinflusst die Expression der präsynaptischen Proteine Synaptophysin, Synaptobrevin und Snap-25

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Phe einen direkten Effekt auf die Expression der Proteine Synaptophysin, Synaptobrevin und Snap-25 in den Dendriten hippocampaler Neurone besitzt. Diese Proteine sind direkt oder indirekt an der Neurotransmitterfreisetzung aus den präsynaptisch lokalisierten Vesikeln beteiligt: Synaptobrevin und Snap-25 als Bestandteile des SNARE-Komplexes und Synaptophysin durch seine Verankerung in der Vesikelmembran. Eine veränderte Expression der Proteine Synaptophysin und Snap-25 konnte bereits im Hippocampus der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus nachgewiesen werden (Horling and Schlegel et al., 2014). Um andere Einflussfaktoren auszuschließen wurden hippocampale Dispersionskulturen verwendet um der Frage eines direkten Phe-Einflusses auf die Expression der genannten Proteine nachzugehen. Für die Bestimmung der Proteinexpressionen wurden die Kulturen nach einer Adaptionszeit an die Kulturbedingungen mit 1 mM, 2 mM oder 5 mM Phe bis zu einem Alter von 16 Tagen behandelt. Die Proteine wurden anschließend immunocytochemisch mit spezifischen Antikörpern markiert. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Proteinexpression entlang der Ausläufer bestimmt werden sollte, wurden Zellkörper und Axonhügel für die Quantifizierung ausgeschlossen.

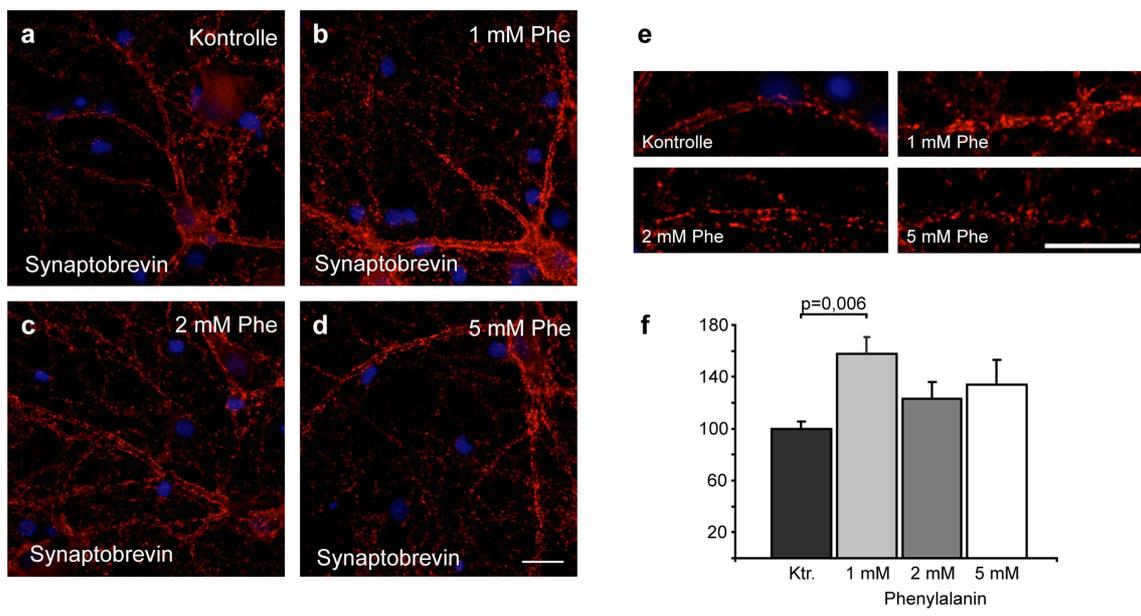
Die Behandlung hippocampaler Neurone mit den gewählten Phe-Konzentrationen führte zu einem signifikanten Unterschied in der Snap-25 Expression ( $F(3,33) = 3,773$ ;  $p = 0,021$ ). Die Behandlung mit 1 mM Phe führte zu einer signifikanten Reduktion der Snap-25 Expression auf 76 % ( $p = 0,03$ ). Die Behandlung mit 2 mM führte zu einer signifikanten Reduktion auf 66 % ( $p = 0,003$ ) und die Behandlung mit 5 mM reduzierte signifikant auf 77 % ( $p = 0,037$ ).



**Abbildung 2-7: Snap-25 Expression in den Ausläufern hippocampaler Neurone**

**a-d:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Snap-25 markierten Neurone. **a** zeigt die Färbung des Proteins unter Kontrollbedingungen, **b–d** nach Behandlung mit 1 mM (**b**), 2 mM (**c**) und 5 mM (**d**) Phe. Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . **e:** Die Abbildungen zeigen Ausschnitte der Snap-25 Färbung unter den jeweiligen Versuchsbedingungen. Die Ausschnitte wurden für die quantitative Auswertung der Proteinexpression entlang der Ausläufer der Neurone gewählt. Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . **f:** Quantitative Auswertung der Farbintensität des Proteins Snap-25.  $n = 3$  unabhängige Kulturen und 60–80 Ausschnitte pro Versuchsbedingung und Kultur; Fehlerbalken zeigen Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

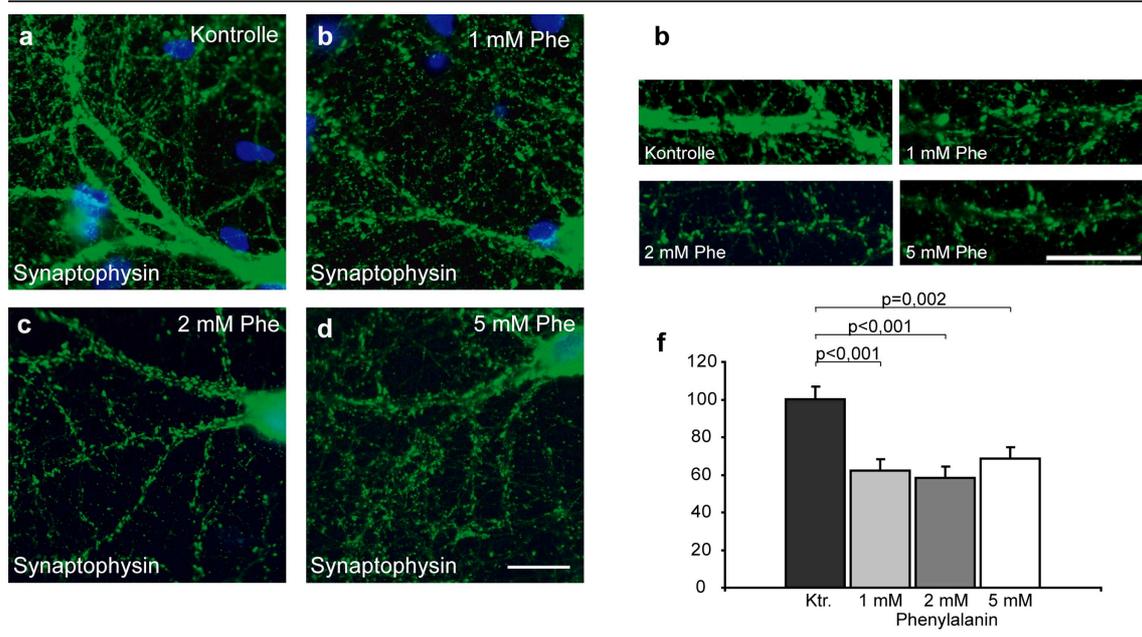
Die Behandlung der hippocampalen Neurone mit den gewählten Phe-Konzentrationen führte zu einem signifikanten Unterschied in der Synaptobrevinexpression ( $F(3,28) = 3,081$ ;  $p = 0,046$ ). Die detaillierte Analyse zeigte nur nach Behandlung mit 1 mM Phe einen signifikanten Anstieg der Synaptobrevinexpression auf 189 % ( $p = 0,006$ ). Die Behandlung mit 2 mM und 5 mM Phe führte zwar zu einem tendenziellen Anstieg auf 154 % und 181 %, beide Anstiege sind jedoch nicht signifikant ( $p = 0,235$  und  $0,093$ ).



**Abbildung 2-8: Synaptobrevinexpression in den Ausläufern hippocampaler Neurone**

**a–d:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Synaptobrevin markierten Neurone. **a** zeigt die Färbung des Proteins unter Kontrollbedingungen, **b–d** nach Behandlung mit 1 mM (**b**), 2 mM (**c**) und 5 mM (**d**) Phe. Balken entspricht 20  $\mu$ m. **e:** Die Abbildungen zeigen Ausschnitte der Synaptobrevinfärbung unter den jeweiligen Versuchsbedingungen. Die Ausschnitte wurden für die quantitative Auswertung der Proteinexpression entlang der Ausläufer der Neurone gewählt. Balken entspricht 20  $\mu$ m. **f:** Quantitative Auswertung der Farbintensität des Proteins Synaptobrevin.  $n = 3$  unabhängige Kulturen und 60–80 Ausschnitte pro Versuchsbedingung und Kultur; Fehlerbalken zeigen Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

Die Behandlung der hippocampalen Neurone mit den gewählten Phe-Konzentrationen führte zu einem signifikanten Unterschied in der Synaptophysinexpression ( $F(3,33) = 8,142$ ;  $p < 0,001$ ). Die Behandlung mit 1 mM Phe führte zu einer signifikanten Reduktion der Synaptophysinexpression auf 62 % ( $p < 0,001$ ). Die Behandlung mit 2 mM führte zu einer Reduktion auf 58 % ( $p < 0,001$ ), die Behandlung mit 5 mM Phe auf 69 % ( $p = 0,002$ ).



**Abbildung 2-9: Synaptophysinexpression in den Ausläufern hippocampaler Neurone**

**a-d:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Synaptophysin markierten Neurone. **a** zeigt die Färbung des Proteins unter Kontrollbedingungen, **b–d** nach Behandlung mit 1 mM (**b**), 2 mM (**c**) und 5 mM (**d**) Phe. Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . **e:** Die Abbildungen zeigen Ausschnitte der Synaptophysinfärbung unter den jeweiligen Versuchsbedingungen. Die Ausschnitte wurden für die quantitative Auswertung der Proteinexpression entlang der Ausläufer der Neurone gewählt. Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . **f:** Quantitative Auswertung der Farbtintensität des Proteins Synaptophysin.  $n = 3$  unabhängige Kulturen und 60–80 Ausschnitte pro Versuchsbedingung und Kultur; Fehlerbalken zeigen Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

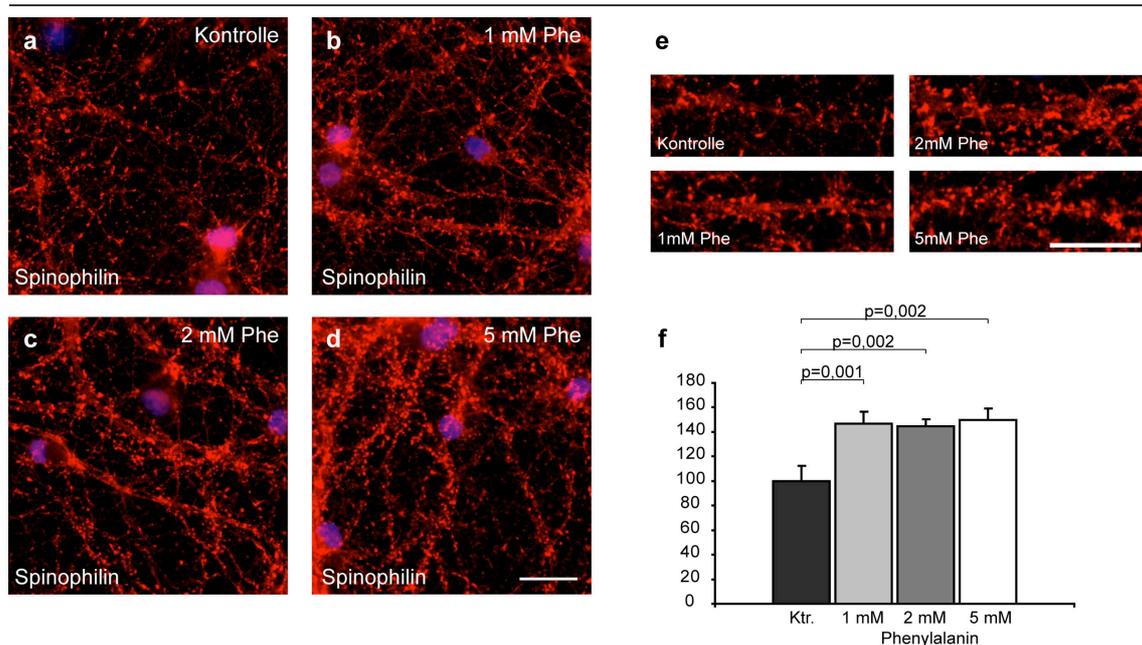
Phe hat einen direkten Effekt auf die Expression der untersuchten präsynaptischen Proteine. Die reduzierte Expression von Synaptophysin und Snap-25 in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus sind somit vermutlich direkt durch erhöhte Phe-Konzentrationen verursacht. Die Synaptobrevinexpression wird nur durch Behandlung mit 1 mM Phe erhöht. Phe besitzt einen dosisabhängigen Effekt auf die Synaptobrevinexpression.

#### 2.4.4 Phenylalanin beeinflusst die Expression des postsynaptischen Proteins Spinophilin, nicht jedoch die Expression von Synaptopodin

In der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus konnte neben der veränderten Expression der präsynaptischen Proteine auch eine veränderte Expression der postsynaptischen Proteine, Spinophilin und Synaptopodin, gezeigt werden (Horling and Schlegel et al., 2014). Beide Proteine sind unter anderem am Aufbau und der Stabilisierung des Zytoskeletts beteiligt. Zur Untersuchung, ob die gesteigerte Expression der Proteine auf einen direkten Effekt der

erhöhten Phe-Konzentrationen zurückzuführen ist, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Aminosäure auf die Expression der beiden postsynaptischen Proteine in hippocampalen Dispersionskulturen untersucht. Das experimentelle Vorgehen entsprach dem der Untersuchung der präsynaptischen Proteine. Die postsynaptischen Proteine wurden ebenso mit spezifischen Antikörpern markiert und die Farbintensität mittels der ImageJ Software gemessen.

Behandlung der hippocampalen Neurone mit Phe-Konzentrationen von 1 mM, 2 mM oder 5 mM führten zu einem signifikanten Unterschied in der Spinophilinexpression in den Ausläufern der hippocampalen Neurone ( $F(3,35) = 6,094$ ;  $p = 0,002$ ). Behandlung mit 1 mM Phe führte zu einem signifikanten Anstieg der Expression auf 147 % ( $p = 0,002$ ). Behandlung mit 2 mM Phe auf 144 % ( $p = 0,001$ ) und Behandlung mit 5 mM Phe führte zu einem signifikanten Anstieg der Spinophilinexpression auf 149 % ( $p = 0,001$ ).

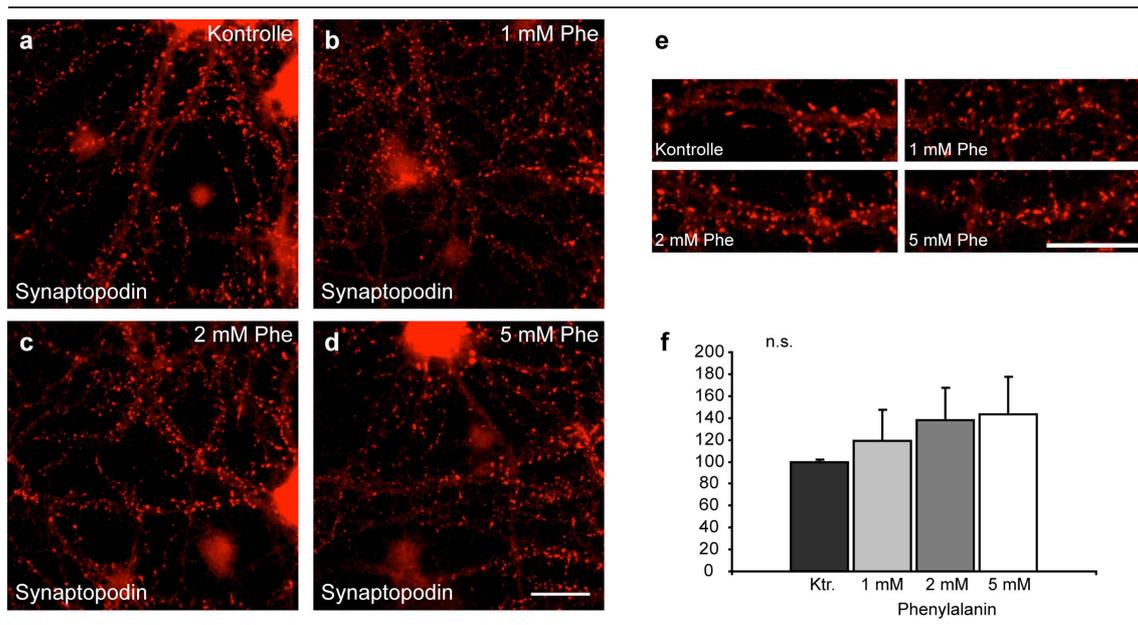


**Abbildung 2-10: Spinophilinexpression in den Ausläufern hippocampaler Neurone**

**a-d:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Spinophilin markierten Neurone. **a** zeigt die Färbung des Proteins unter Kontrollbedingungen, **b-d** Behandlung mit 1 mM (**b**), 2 mM (**c**) und 5 mM (**d**) Phe. Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . **e:** Die Abbildungen zeigen Ausschnitte der Spinophilinfärbung unter den jeweiligen Versuchsbedingungen. Die Ausschnitte wurden für die quantitative Auswertung der Proteinexpression entlang der Ausläufer der Neurone gewählt. Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . **f:** Quantitative Auswertung der Farbintensität des Proteins Spinophilin.  $n = 3$  unabhängige Kulturen und 60–80 Ausschnitte pro Versuchsbedingung und Kultur; Fehlerbalken zeigen Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

## Ergebnisse

Die Behandlung der hippocampalen Neurone mit Phe zeigte keinen Einfluss auf die Expression von Synaptopodin ( $F(3,32) = 0,458$ ;  $p = 0,714$ ). Behandlung der Neurone mit 1 mM Phe führte zu einem Anstieg der Expression auf 119 % ( $p = 0,643$ ), Behandlung mit 2 mM auf 138 % ( $p = 0,358$ ) und Behandlung mit 5 mM auf 143 % ( $p = 0,305$ ).



**Abbildung 2-11: Synaptopodinexpression in den Ausläufern hippocampaler Neurone**

**a–d:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Synaptopodin markierten Neurone. **a** zeigt die Färbung des Proteins unter Kontrollbedingungen, **b–d** nach Behandlung mit 1 mM (**b**), 2 mM (**c**) und 5 mM (**d**) Phe. Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . **e:** Die Abbildungen zeigen Ausschnitte der Synaptopodinfärbung unter den jeweiligen Versuchsbedingungen. Die Ausschnitte wurden für die quantitative Auswertung der Proteinexpression entlang der Ausläufer der Neurone gewählt. Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . **f:** Quantitative Auswertung der Farbtintensität des Proteins Synaptopodin.  $n = 3$  unabhängige Kulturen und 60–80 Ausschnitte pro Versuchsbedingung und Kultur; Fehlerbalken zeigen Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

Phe steigert in allen Konzentrationen die Expression von Spinophilin, hat im Gegensatz dazu jedoch in keiner der eingesetzten Konzentrationen einen Einfluss auf die Synaptopodinexpression. Die gesteigerte Synaptopodinexpression in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus kann somit nicht auf einen direkten Phe Effekt zurückgeführt werden.

## 2.5 Beeinflussung der Signaltransduktion durch Phenylalanin

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob die erhöhten Phe-Spiegel zur Stabilisierung oder Destabilisierung des Aktinzytoskeletts führen und ob der Einfluss über den CaMKII–Rac1-Signalweg vermittelt wird. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigen eine Beeinflussung dieser Proteine durch erhöhte Phe-Spiegel (de Freitas et al., 1997, Zhang et al., 2007). Zur Klärung der Frage wurde in der vorliegenden Arbeit zuerst der Einfluss von Phe auf das Aktin-assoziierte Protein Cofilin untersucht. Zur Identifizierung eines Signalwegs, der zum Umbau des Zytoskeletts führt, wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängige Protein Kinase II sowie die GTPase Rac1 untersucht. Ziel war es, den Einfluss von Phe anhand einer zusammenhängenden Signalkaskade zu untersuchen.

### 2.5.1 Phenylalanin beeinflusst die Aktivität des Aktin-assoziierten Proteins Cofilin

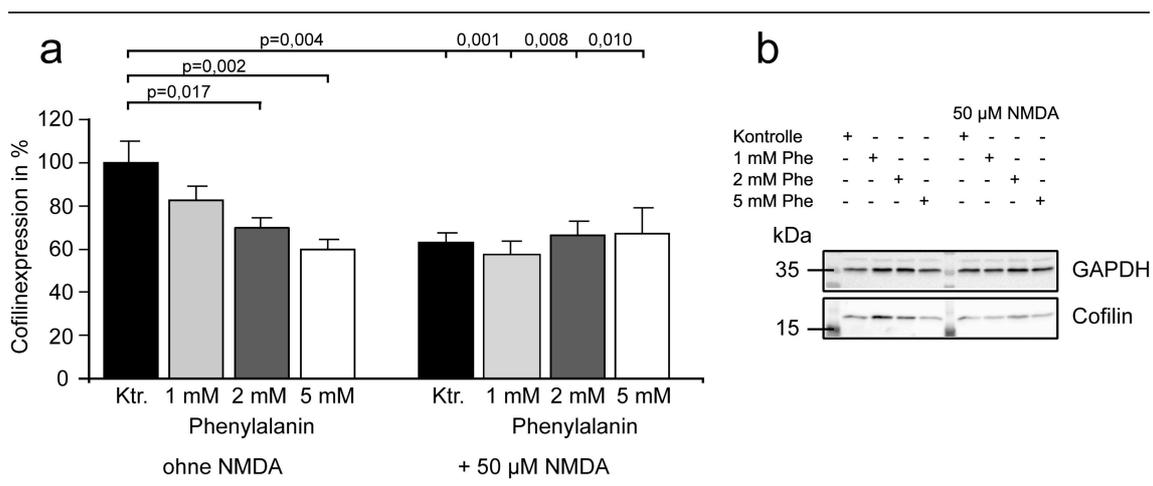
Um die Frage zu beantworten, ob die Aminosäure Phe Einfluss auf das Zytoskelett hat, wurde das Aktin-assoziierte Protein Cofilin, welches an der Stabilisierung sowie am Umbau des Aktinzytoskeletts beteiligt ist, untersucht. In seiner freien Form führt Cofilin zur Dissoziation von Aktinmonomeren, welche durch Umbau an anderen Stellen wieder an das Aktinfilament angebaut werden können. Dieser Umbauprozess führt zur Ausbildung neuer Dendritenverzweigungen und Spines. Das Protein wird durch Phosphorylierung inaktiviert und steht in der Folge für die Umbauprozesse nicht mehr zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Phe auf die Expression des Gesamtproteins Cofilin und auf dessen phosphorylierte Form untersucht. Die hippocampalen Neurone wurden nach einer Adaptionszeit von 3 Tagen für 12 Tage mit den gewählten Phe-Konzentrationen behandelt. Um den Einfluss von Phe während exogener Aktivierung hippocampaler Neurone zu untersuchen, wurden diese zusätzlich zur Phe-Behandlung für 10 min mit NMDA (50  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Für die Proteinanalysen wurden die Zellen lysiert und die Menge an Cofilin und p-Cofilin mit Hilfe des Western Blots nachgewiesen.

Behandlung der hippocampalen Neurone mit Phe führte zu einem signifikanten Unterschied in der Cofilinexpression ( $F(7,55) = 2,686$ ;  $p = 0,02$ ). Behandlung der

## Ergebnisse

hippocampalen Neurone mit höheren Dosen Phe, 2 mM und 5 mM, führte zu einer signifikanten Reduktion der Cofilinexpression auf 70 % ( $p = 0,017$ ) und 60 % ( $p = 0,002$ ). Behandlung mit 1 mM Phe reduziert die Gesamtexpression des Proteins lediglich auf 82 % ( $p = 0,162$ ). Die Kurzzeitstimulation mit NMDA unter Kontrollbedingungen führte zu einer signifikanten Reduktion des Proteins auf 63 % ( $p = 0,004$ ), verglichen zur Cofilinexpression unter Kontrollbedingungen ohne NMDA-Stimulation. Die vorangehende Behandlung mit 1 mM Phe führte zu einer Reduktion auf 58 % ( $p = 0,001$ ), vorangehende Behandlung mit 2 mM Phe zu einer Reduktion auf 66 % ( $p = 0,008$ ) und vorangehende Behandlung mit 5 mM reduzierte die Cofilinexpression auf 67 % ( $p = 0,01$ ; Abbildung 2-12 a). Der Vergleich der Cofilinexpressionen nach NMDA-Kurzzeitstimulation untereinander, zeigte keinen Unterschied zwischen den NMDA-stimulierten Behandlungsgruppen.

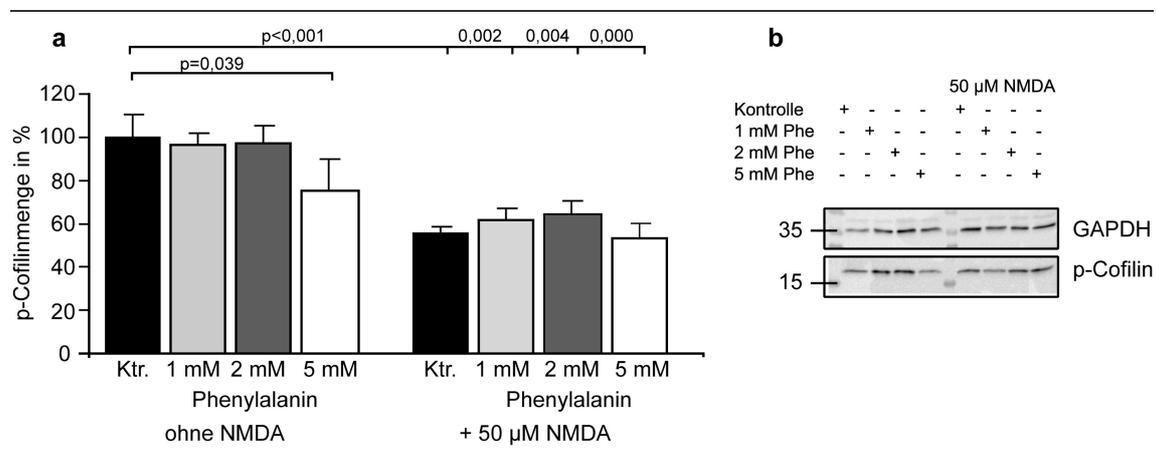


**Abbildung 2-12: Quantifizierung der Cofilinexpression**

**a:** Quantifizierung der Cofilinexpression. Diagramm zeigt Expressionen prozentual zur Kontrolle. Links die Daten ohne NMDA-Stimulation, rechts nach Kurzzeitstimulation mit 50  $\mu$ M NMDA. **b:** Abbildung des Western Blots. Links die Proteinlysate ohne zusätzliche NMDA-Stimulation, rechts nach NMDA-Stimulation. Die obere Reihe zeigt die Expression der Ladungskontrolle GAPDH, die untere Reihe die Cofilinexpression.  $n = 4$  unabhängige Versuchsansätze in Dreifachbestimmung; Fehlerbalken zeigen die Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

Die Bestimmung der p-Cofilinmenge zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen auf ( $F(7,47) = 5,813$ ;  $p < 0,001$ ). Die Behandlung der hippocampalen Neurone mit 1 mM und 2 mM Phe führte lediglich zu einer Reduktion der p-Cofilinmenge auf 97 % ( $p = 0,773$ ) und 97 % ( $p = 0,813$ ). Behandlung der Neurone mit 5 mM Phe hingegen, reduzierte die p-Cofilinmenge signifikant auf

75 % ( $p = 0,039$ ). Die Kurzzeitstimulation mit NMDA führte zu einer signifikanten Abnahme der Cofilin-Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen auf 56 % ( $p < 0,001$ ), verglichen mit der p-Cofilinmenge unter den Kontrollbedingungen ohne NMDA-Stimulation. Die vorangegangene Behandlung mit 1 mM Phe reduzierte die p-Cofilinmenge auf 62 % ( $p = 0,002$ ), Vorbehandlung mit 2 mM Phe auf 64 % ( $p = 0,004$ ) und unter Vorbehandlung mit 5 mM Phe auf 53 % ( $p < 0,001$ ; Abbildung 2-13 a). Der Vergleich der Mengen an phosphoryliertem Cofilin nach NMDA-Stimulation untereinander, zeigte auch für die p-Cofilinmenge keinen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen ( $F(3,23) = 0,876$ ,  $p = 0,47$ ).



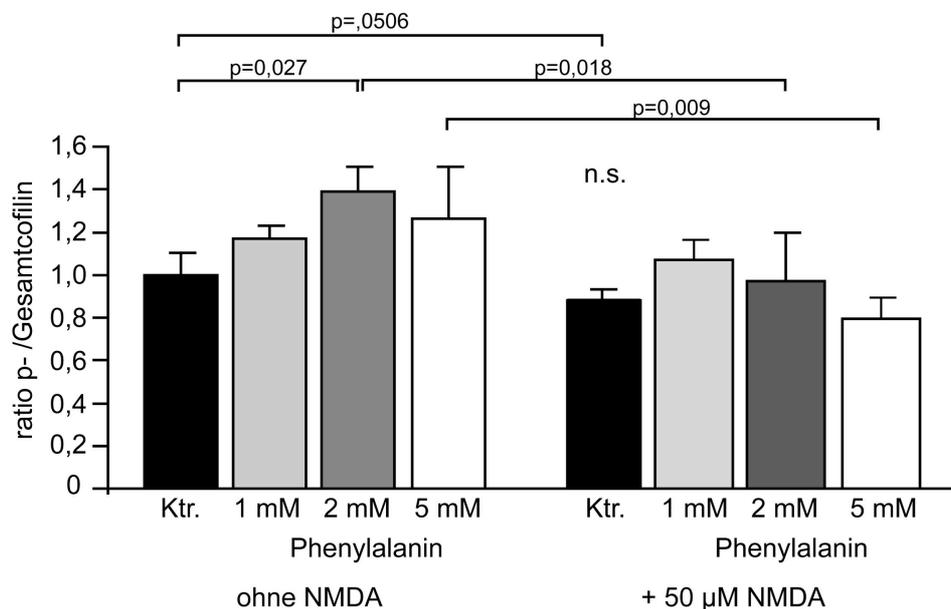
**Abbildung 2-13: Quantifizierung der p-Cofilinmenge**

**a:** Quantifizierung der p-Cofilinmenge. Diagramm zeigt die Menge p-Cofilin prozentual zur Kontrolle. Links die Daten ohne NMDA-Stimulation, rechts nach Kurzzeitstimulation mit 50 µM NMDA. **b:** Abbildung der Western Blots. Links die Proteinlysate ohne zusätzliche NMDA-Stimulation, rechts nach NMDA-Stimulation. Die obere Reihe zeigt die Expression der Ladungskontrolle GAPDH, die untere Reihe zeigt p-Cofilin.  $n = 4$  unabhängige Versuchsansätze in Dreifachbestimmung; Fehlerbalken zeigen die Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

Bildet man das Verhältnis von p-Cofilin zum Gesamtcofilin (Abbildung 2-14), führte lediglich die Behandlung mit 2 mM Phe zu einem signifikanten Anstieg der Ratio auf 1,4 ( $p = 0,027$ ). Die Behandlung mit 1 mM führte zu einem Anstieg auf 1,17 ( $p = 0,333$ ), die Behandlung mit 5 mM Phe auf 1,26 ( $p = 0,134$ ). Die zusätzliche Kurzzeitstimulation mit NMDA führte unter keiner der gewählten Behandlungen zu einer Veränderung des Verhältnisses. Die zusätzliche NMDA-Stimulation unter Kontrollbedingungen reduzierte das Verhältnis auf 0,89 ( $p = 0,506$ ), vorangehende Behandlung mit 1 mM Phe führte zu keiner Veränderung 1,07 ( $p = 0,682$ ), wie auch die Vorbehandlung mit 2 mM unverändert bei 0,97 ( $p = 0,866$ ) blieb. Die Vorbehandlung mit 5 mM Phe

## Ergebnisse

reduzierte das Verhältnis auf 0,8 ( $p = 0,237$ ). Auch unterhalb der NMDA-stimulierten Gruppen zeigte sich kein Unterschied.



**Abbildung 2-14: Verhältnis p-Cofilin zu Gesamtcofilin**

Verhältnis p-Cofilin zur Gesamtcofilinexpression. Links das Verhältnis ohne NMDA-Stimulation, rechts nach zusätzlicher NMDA-Stimulation. Fehlerbalken zeigen die Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

Phe hat einen dosisabhängigen Effekt sowohl auf die Gesamtexpression des Proteins Cofilin, wie auch auf dessen Aktivität. Hohe Dosen Phe (5 mM) führten zwar zu einer verstärkten Inaktivierung des Proteins, aber durch die reduzierte Expression des Gesamtproteins kommt es zu keiner Änderung des Verhältnisses. Die Behandlung mit 2 mM Phe führte zu einer verminderten Expression, die Inaktivierung blieb jedoch auf Kontrollniveau. Daraus ergibt sich ein gesteigertes Verhältnis phosphorylierten Cofilins zu Gesamtcofilin. Die Behandlung mit 1 mM Phe hatte weder einen Effekt auf die Expression des Proteins noch auf dessen Aktivität. Die Kurzzeitstimulation mit NMDA führte trotz vorangehender Phe-Behandlung zu einer signifikanten Abnahme der Gesamtexpression sowie zu einer Abnahme des phosphorylierten Proteins.

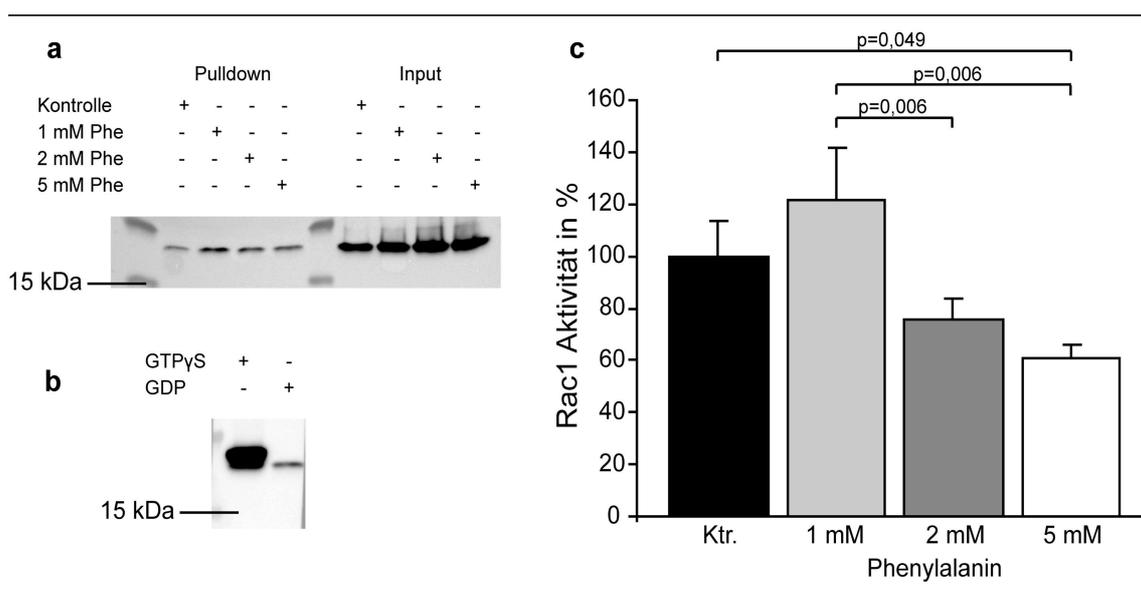
Steigert man durch exogene Aktivierung der NMDA-Rezeptoren den Kalziumeinstrom, kommt es zur Aufhebung der Phe-induzierten Effekte auf das Aktin-assoziierte Protein Cofilin.

### 2.5.2 Phenylalanin beeinflusst die Aktivität der GTPase Rac1

Um die Frage nach der Beteiligung der GTPase Rac1 an den Phe-induzierten morphologischen Veränderungen zu klären, wurde die Aktivität der GTPase mittels GST-Pulldown bestimmt. Rac1 gehört zur großen Klasse der Rho-GTPasen und spielt eine wichtige Rolle bei der Dendritenverzweigung (Kozma et al., 1997). Wie jede GTPase liegt auch Rac1 in zwei Formen vor: der aktivierten, GTP-gebundenen Form und der inaktiven, GDP-gebundenen.

Die Behandlung der hippocampalen Neurone führte zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen ( $F(3,21) = 3,784$ ;  $p = 0,029$ ). Die Behandlung mit 5 mM Phe führte zu einer signifikanten Reduktion des GTP-gebundenen, aktiven Rac1 auf 61 % ( $p = 0,049$ ), verglichen mit Kontrollbedingungen. Die Behandlung mit 1 mM Phe führte zu einer tendenziellen Steigerung der Aktivität auf 121 % ( $p = 0,283$ ), Behandlung mit 2 mM Phe reduzierte auf 75 % ( $p = 0,224$ ). Der Vergleich der Phe-Behandlungen auf die Aktivität der GTPase untereinander zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlung mit 1 mM und 5 mM Phe ( $p = 0,006$ ) und auch zwischen der Behandlung mit 2 mM und 5 mM Phe ( $p = 0,006$ ).

Phe reduziert in hohen Dosen die Aktivität der GTPase Rac1 und besitzt zudem einen dosisabhängigen Effekt. Niedrigere Konzentrationen (1 mM und 2 mM) führen zu keiner Veränderung der Aktivität.



**Abbildung 2-15: Einfluss von Phenylalanin auf die GTPase Rac1**

**a:** Abbildung eines Western Blots mit Lysaten nach GST-Pulldown der aktivierten GTPase Rac1. Der Blot zeigt sowohl die Banden des Pulldowns als auch des dazugehörigen Inputs. **b:** Western Blot der Positivkontrollen des GST-Pulldowns. Zelllysate wurde vor dem Pulldown entweder mit nicht hydrolysierbarem, G-Protein aktivierendem GTPγS oder mit dem inhibierenden GDP inkubiert. Die Banden zeigen deutlich den Unterschied zwischen dem aktivierten und dem inhibierten Rac1. **c:** Quantifizierung des GTP-gebundenen Rac1. n = 8; Fehlerbalken zeigen die Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

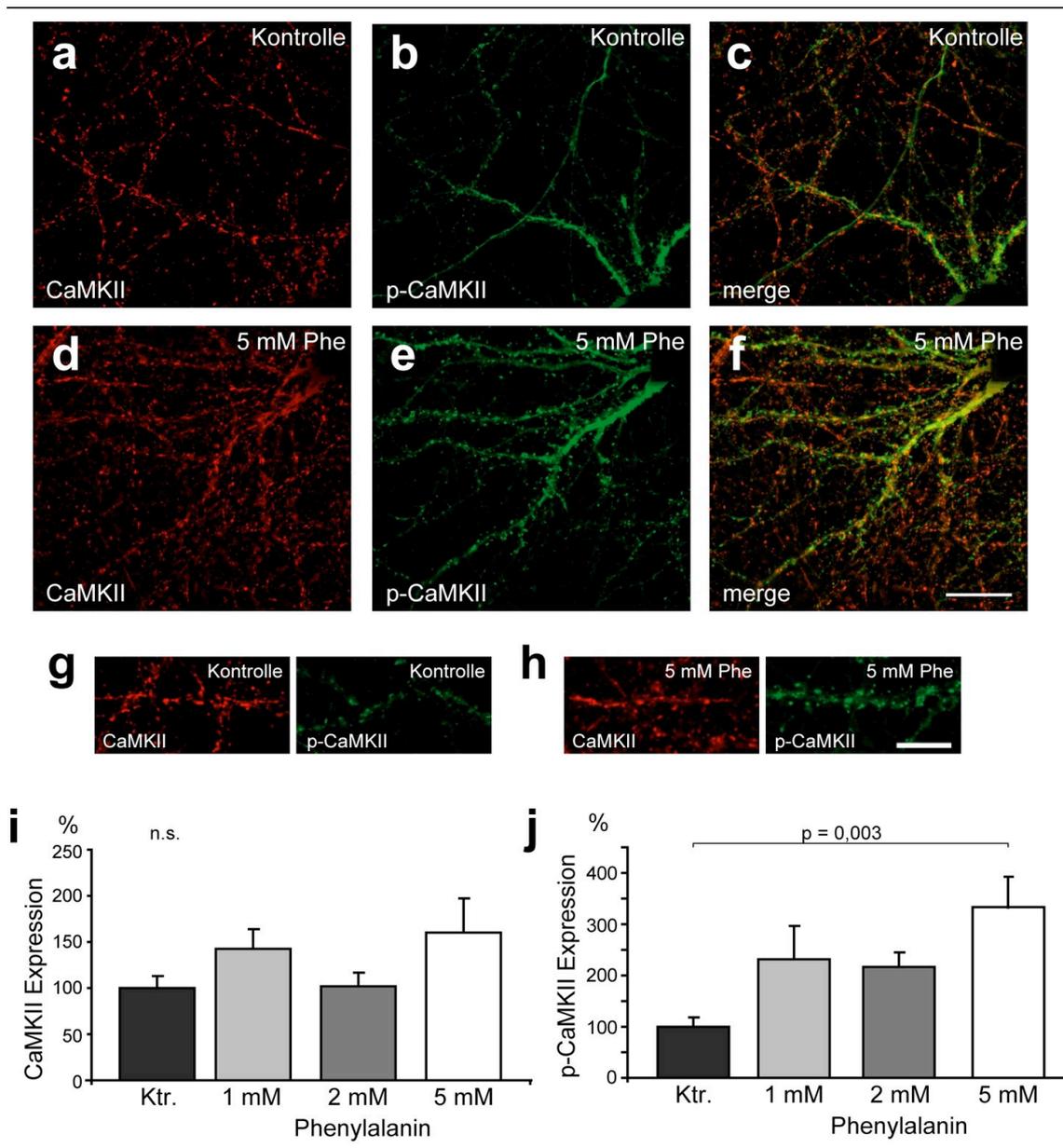
### 2.5.3 Phenylalanin beeinflusst die Aktivität der CaMKII

Das Enzym wird kalziumabhängig phosphoryliert und dadurch aktiviert. Es führt zur Aktivierung von Guanin-Austausch-Faktoren (englisch: GEFs), welche wiederum den Austausch von GDP-gebundenen Rac1 hin zu GTP-gebundenem bewirken (Rossman et al., 2005). Eine weitere wichtige Aufgabe ist die Phosphorylierung von AMPA-Rezeptoren (Lisman et al., 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde immunocytochemisch in den neuronalen Ausläufern die Expression des Enzyms sowie der Anteil an aktivierter, phosphorylierter Form bestimmt. Aufnahmen der Immunfärbungen sind in Abbildung 2-16 gezeigt. Die Expression des Enzyms in den Ausläufern und Dornenfortsätzen ist deutlich zu sehen. Für die quantitative Auswertung wurde, wie auch für die Quantifizierung der prä- und postsynaptischen Proteine, die Farbintensität in Ausschnitten um die Ausläufer bestimmt (Abbildung 2-16 g, h) und die Bereiche der Zellkörper und Axonhügel ausgeschlossen.

In keiner der gewählten Konzentrationen führte die Behandlung mit Phe zu einem Unterschied in der Gesamtexpression des Enzyms ( $F(3,49) = 1,608$ ;  $p = 0,2$ ). Behandlung mit 1 mM und 5 mM Phe führte zu einer tendenziellen Steigerung der Expression auf 142 % ( $p = 0,335$ ) und 160 % ( $p = 0,169$ ). Behandlung mit 2 mM Phe führte zu keiner messbaren Änderung der Expression (102 %,  $p = 0,972$ ).

Die Bestimmung der p-CaMKII Menge zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen den Gruppen ( $F(3,49) = 1,746$ ;  $p = 0,172$ ). Die Behandlung mit 5 mM Phe führte jedoch zu einer signifikanten Zunahme der phosphorylierten Form auf 333 % ( $p = 0,003$ ). Die Behandlung mit 1m M Phe erhöhte die Expression tendenziell auf 231 % ( $p = 0,101$ ), die Behandlung mit 2 mM Phe auf 217 % ( $p = 0,106$ ).

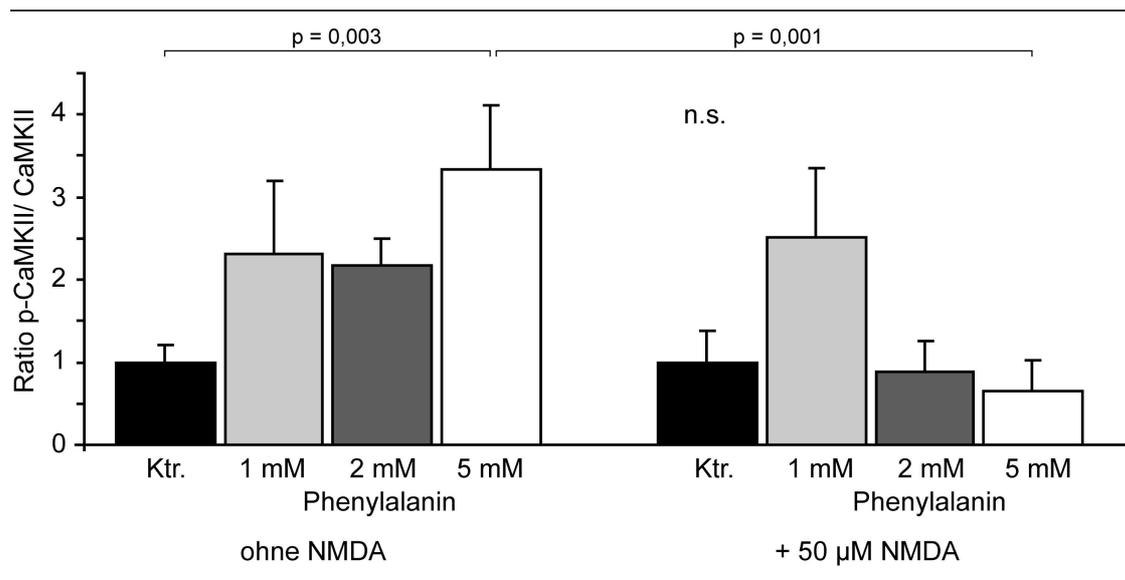


**Abbildung 2-16: Expression der CaMKII und p-CaMKII**

**a–f:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der CaMKII und p-CaMKII Komarkierung in hippocampalen Neuronen. **a–c** zeigen die Färbungen unter Kontrollbedingungen, **d–f** zeigen die Färbungen unter Behandlung mit 5 mM Phe. **a+d** zeigen die CaMKII in rot. **b+e** zeigen die p-CaMKII in grün. **c+f** zeigen die Überlagerungen der beiden Aufnahmen. Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . **g–h:** Ausschnitte zur Bestimmung der Farbtintensität unter Kontrollbedingungen (**g**) und nach Behandlung mit 5 mM (**h**). **i–j:** Quantifizierung der (**i**) CaMKII Expression und (**j**) p-CaMKII Menge.  $n = 3$  unabhängige Kulturen und jeweils 100–140 Aufnahmen pro Versuchsbedingung; Fehlerbalken zeigen Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,01$ ; Levene Test  $p < 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

Abbildung 2-17 zeigt das Verhältnis p-CaMKII zur Gesamtexpression. Behandlung mit 5 mM Phe führte zu einem signifikanten Anstieg des Verhältnisses um das dreifache ( $p = 0,003$ ). Die Behandlung mit 1 mM und 2 mM Phe führte zu keiner Veränderung

der Ratio. Die zusätzliche Stimulation der Neurone mit 50  $\mu$ M NMDA führte trotz vorangehender Behandlung mit 5 mM Phe zu keiner Veränderung des Verhältnisses verglichen mit den Kontrollbedingungen. Die zusätzliche NMDA-Stimulation führte jedoch zu einem signifikanten Rückgang der Ratio verglichen mit der Ratio während der Behandlung mit 5 mM Phe ( $p = 0,001$ ).



**Abbildung 2-17: Verhältnis p-CaMKII zu CaMKII**

Das Diagramm zeigt das Verhältnis von p-CaMKII zur Gesamtproteinmenge. Links die Verhältnisse ohne NMDA, rechts nach NMDA-Stimulation. Fehlerbalken zeigen Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

Phe hat einen dosisabhängigen Effekt auf die Aktivität der CaMKII. Stark erhöhte Konzentrationen (5 mM) führen zu einer gesteigerten Aktivität bei gleich bleibender Gesamtexpression des Proteins. Niedrigere Dosen Phe (1 mM und 2 mM) haben weder Einfluss auf die Aktivität noch auf die Gesamtexpression des Enzyms. Zusätzliche Kurzzeitstimulation mit NMDA hebt den Phe-induzierten Effekt auf das Enzym auf.

Die exogene Aktivierung der NMDA-Rezeptoren führt zum ‚Rescue‘ des 5 mM Phe-induzierten Effekts auf die CaMKII Aktivität.

## 2.6 Beeinflusst Phenylalanin die Aktivität von Mikroglia?

Untersuchungen im *in-vivo* Modell zeigen ein gestörtes synaptisches Pruning im Hippocampus der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus (Horling and Schlegel et al., 2014). Verschiedene

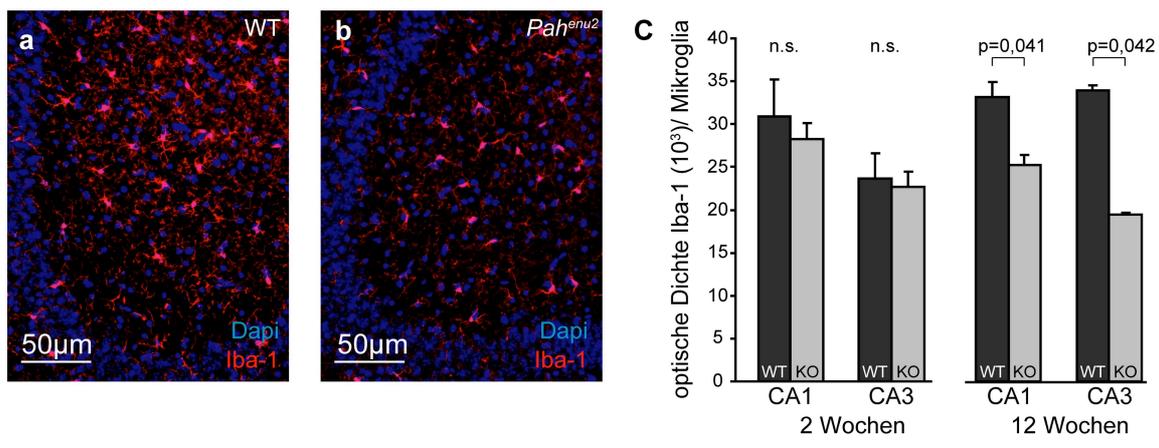
Arbeitsgruppen konnten bereits einen Einfluss von Mikroglia auf das synaptische Pruning zeigen (Paolicelli et al., 2011, Zhan et al., 2014). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Aktivität von Mikroglia in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus und deren Wildtyp (WT) Geschwister untersucht. Zur Klärung der Frage eines direkten Phe-Effektes, wurde in einem zweiten Ansatz in hippocampalen Gewebekulturen der Einfluss von Phe auf die Mikrogliaaktivität untersucht.

### 2.6.1 Reduzierte Aktivität von Mikroglia in adulten *Pah<sup>enu2</sup>* Mäusen

Die Aktivität von Mikroglia wurde im Hippocampus von 2 und 12 Wochen alten *Pah<sup>enu2</sup>* Mäusen und deren WT-Geschwister untersucht. Zur Bestimmung der Mikrogliaaktivität wurde die Farbintensität von Iba-1 (ionisiertes, Kalzium-bindendes Adapter Molekül 1) bestimmt. Iba-1 wird exklusiv und aktivitätsabhängig in Mikroglia exprimiert und eignet sich somit zur Bestimmung der Aktivität (Ito et al., 1998, Ito et al., 2001). Die CA1 und CA3 Regionen wurden separat ausgewertet. Abbildung 2-18 zeigt die Iba-1 markierten Mikroglia in der CA3 Region des Hippocampus von 12 Wochen alten WT (Abbildung 2-18 a) und *Pah<sup>enu2</sup>* Tieren (Abbildung 2-18 b) (Horling and Schlegel et al., 2014).

Im Alter von zwei Wochen zeigte sich kein Unterschied in der Mikrogliaaktivität für die CA1 ( $F(1,23) = 0,2$ ,  $p = 0,659$ ) oder CA3 ( $F(1,7) = 0,077$ ,  $p = 0,79$ ) Region der *Pah<sup>enu2</sup>* Mäusen im Vergleich zu ihren WT-Geschwistern. Die Messung der Aktivität bei 12 Wochen alten Tieren hingegen zeigte eine signifikante Reduktion der Iba-1 Intensität in den Hippocampi der *Pah<sup>enu2</sup>* Mäuse verglichen mit der Iba-1 der WT-Tiere. Die Aktivität wurde in der CA1 Region signifikant auf 69 % ( $p = 0,041$ ) reduziert. In der CA3 Region kam es zu einer signifikanten Reduktion auf 47 % ( $p = 0,042$ , Abbildung 2-18 c).

Mikroglia adulter *Pah<sup>enu2</sup>* Mäuse zeigen in der CA1 und CA3 Region des Hippocampus eine reduzierte Aktivität. In jungen *Pah<sup>enu2</sup>* Mäusen hingegen (2 Wochen alt), ist kein Unterschied in der Aktivität messbar.



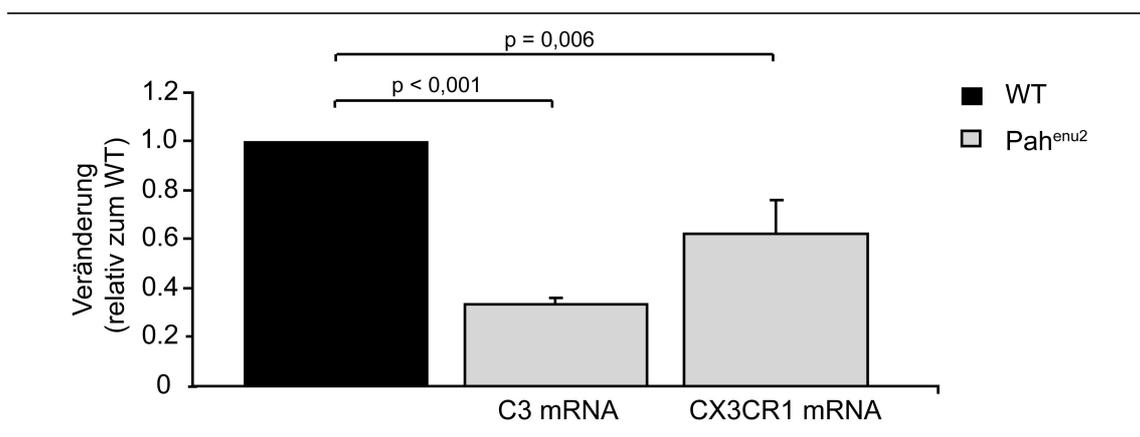
**Abbildung 2-18: Mikrogliaktivität in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus (modifiziert nach Horling, 2014)**

**a–b:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der CA3 Region des Hippocampus aus einer 12 Wochen alten WT (**a**) und *Pah<sup>enu2</sup>* Maus (**b**). Zu sehen ist die Iba-1 Färbung in rot, sowie die Kernfärbung mittels DAPI in blau. Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$ . **c:** Quantifizierung der Iba-1 Intensität pro Mikroglium. In schwarz die Daten der WT-Tiere, in hellgrau die Daten der *Pah<sup>enu2</sup>* Tiere (KO). Auf der linken Seite sind die Daten der 2 Wochen alten Tiere dargestellt, rechts die der adulten, 12 Wochen alten Tiere.  $n = 3$  Tiere und jeweils 4–5 Schnitten pro Genotyp und Alter; Fehlerbalken entsprechen Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

### 2.6.2 Reduzierte mRNA Level in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus

Für die Aktivierung der Mikroglia kommen verschiedene Mechanismen in Frage. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA für den Komplementfaktor C3, sowie die mRNA für den Rezeptor CX3CR1 im Hippocampus adulter *Pah<sup>enu2</sup>* Mäuse und ihrer WT-Geschwister untersucht. Der Komplementfaktor C3 wird in den Pyramidenzellen der CA3 Region sowie von den Gliazellen in der Molekularschicht (Morita et al., 2006), der Rezeptor CX3CR1 hingegen spezifisch von Mikroglia exprimiert (Imai et al., 1997). Zur Bestimmung der mRNA Mengen des C3 und CX3CR1 wurde eine TaqMan basierte *real-time* qPCR durchgeführt. Die semiquantitative Bestimmung der mRNA Menge ergab eine signifikante Reduktion der mRNA Menge des Komplementfaktors C3 auf 33 % ( $p < 0,001$ ) und eine signifikante Reduktion der mRNA Menge von CX3CR1 auf 63 % ( $p = 0,006$ ).

Die mRNAs für C3 und CX3CR1 sind in ihrer Expression in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus signifikant reduziert.



**Abbildung 2-19: Quantifizierung der PCR nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode**

Das Diagramm zeigt in hellgrau die Veränderungen der mRNA Level, relativ zu den WT Tieren.  $n = 5$  Tiere pro Genotyp mit jeweils zwei Durchläufen und Dreifachbestimmung. Fehlerbalken entsprechen Standardfehler (SEM); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; t-Test

### 2.6.3 Einfluss von Phenylalanin auf die Mikrogliaaktivität

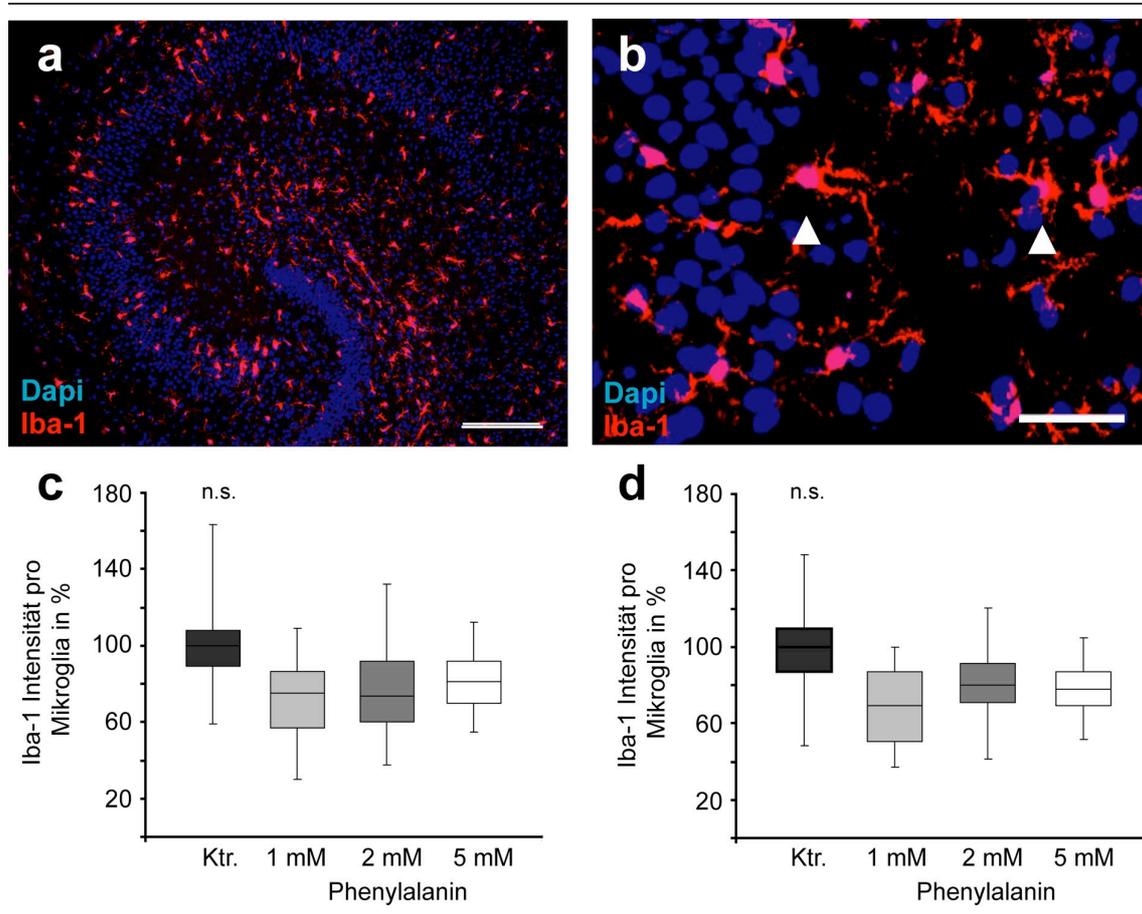
Um der Frage nachzugehen, ob die Aktivität der Mikroglia direkt durch die Aminosäure Phe beeinflusst wird, wurden hippocampale Gewebekulturen mit Phe (1 mM, 2 mM und 5 mM) behandelt. Hippocampale Gewebekulturen eignen sich zur Untersuchung von Mikroglia, da durch die Entnahme des gesamten Hippocampus und dessen Kultivierung der Gewebeverband bestehen bleibt und Mikroglia folglich nicht aus der Kultur entfernt werden (Hailer et al., 1996). Kryostatschnitte der Gewebekulturen wurden ebenfalls mit dem Iba-1 spezifischen Antikörper markiert und die Kerne mittels DAPI sichtbar gemacht.

Die Auswertung der Iba-1 Intensität in der CA1 Region zeigte keinen Unterschied für die Behandlungsgruppen ( $F(3,63) = 1,797$ ,  $p = 0,157$ ). Die Intensität der Iba-1 Färbung pro Mikroglia wurde durch Behandlung mit 1 mM Phe tendenziell auf 80 % ( $p = 0,158$ ) reduziert, die Behandlung mit 2 mM Phe reduzierte auf 76 % ( $p = 0,095$ ) und die Behandlung mit 5 mM auf 76 % ( $p = 0,084$ ).

Die quantitative Auswertung der CA3 Region zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Iba-1 Intensität pro Mikroglia innerhalb der Behandlungsgruppen ( $F(3,57) = 2,266$ ,  $p = 0,091$ ). Die Behandlung der hippocampalen Neurone mit 1 mM Phe führte zu einer Reduktion der Iba-1 Intensität auf 86 % ( $p = 0,314$ ), Behandlung mit 2 mM Phe führte zu einer Abnahme auf 66 % ( $p = 0,014$ ) und Behandlung mit 5 mM

auf 84 % ( $p = 0,251$ ). Aufgrund der nicht ausreichenden Homogenität der Varianzen (Levene Test:  $p < 0,05$ ) wurde das Signifikanzniveau auf  $p = 0,01$  gesetzt.

Phe hat in erhöhten Konzentrationen keinen direkten Einfluss auf die Aktivität der Mikroglia in der CA1 und CA3 Region in organotypischen Gewebekulturen.



**Abbildung 2-20: Mikrogliaaktivität in hippocampalen Gewebekulturen**

**a-b:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Immunfärbung gegen das in Mikroglia exprimierte Iba-1. **a:** Aufnahme des gesamten Hippocampus unter Kontrollbedingungen. Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ . **b:** Vergrößerung aus der CA3 Region. Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$ . In rot ist die Iba-1 Färbung der Mikroglia zu sehen, in blau die Kernfärbung mittels DAPI. **c+d:** Quantifizierung der Iba-1 Intensität pro Mikroglia für die CA1 (**c**) und die CA3 (**d**) Region.  $n = 3$  unabhängige Kulturen und jeweils 3–5 Schnitten pro Versuchsbedingung; Levene Test  $< 0,05$ ; Signifikanzniveau  $p \leq 0,01$ ; ANOVA + Post-hoc Test.

## Diskussion

### 3 Diskussion

#### 3.1 Phenylalanin hat einen direkten Einfluss auf die Entwicklung hippocampaler Neurone *in-vitro*

Die richtige Entwicklung von Dendriten ist für die Aufnahme, die Weiterleitung und die Verarbeitung eingehender Informationen elementar. Störungen der Substanzen, welche die Entwicklung von Dendriten beeinflussen, haben einen maßgeblichen Einfluss auf die neuronale Funktion und Verbindungen. In verschiedenen Erkrankungen, die mit der Ausbildung einer mentalen Retardierung einhergehen, konnte bereits eine veränderte Dendritenverzweigung für verschiedene Hirnareale gezeigt werden. Im visuellen Cortex von Kindern mit Down-Syndrom, die weniger als sechs Monate alt waren, wurde eine normale bis gesteigerte Verzweigung festgestellt, wohingegen bei Kindern ab zwei Jahren die Verzweigung der Dendriten deutlich reduziert war (Becker et al., 1986). Diese Erkenntnisse wurden durch Untersuchungen weiterer Arbeitsgruppen (Schulz and Scholz, 1992, Prinz et al., 1997) im parietalen Assoziationscortex und Motorcortex bestätigt. Untersuchungen an Patientinnen mit Rett-Syndrom zeigten für verschiedenste Altersstufen reduzierte Dendritenlängen im motorischen und präfrontalen Cortex (Armstrong et al., 1995, Armstrong et al., 1998). *Post mortem* Untersuchungen an Gehirnen adulter, unbehandelter PKU Patienten zeigte eine reduzierte Anzahl, Länge und Verzweigung der Dendriten des motorischen, visuellen und präfrontalen Cortex (Bauman and Kemper, 1982). Im Cortex von Ratten, die Phe-Injektionen erhielten, konnte ebenfalls eine reduzierte Dendritenverzweigung gezeigt werden (Cordero et al., 1983). Die Arbeitsgruppe um Li (Li et al., 2010) konnte *in-vitro* den hemmenden Einfluss verschiedener Phe-Konzentrationen (0,9–5 mM) auf die Länge des längsten Neuriten in primären Cortexneuronen zeigen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in primären hippocampalen Dispersionskulturen eine signifikant reduzierte Dendritenverzweigung nach Behandlung der Neurone mit 5 mM Phe gezeigt werden. Da mit Hilfe des TUNEL-Assays toxische Effekte der eingesetzten Phe-Konzentrationen ausgeschlossen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die Wirkung von erhöhtem Phe auf die Morphologie und die untersuchten Proteine, nicht durch eine verminderte Vitalität der Neurone verursacht

sind. Im Gegensatz dazu konnte nach der Behandlung mit 1 mM Phe, mit Hilfe der Sholl-Analyse, eine signifikant gesteigerte Verzweigung gezeigt werden. Bei der Behandlung mit 2 mM Phe war exakt die Konzentration erreicht, die zur Umkehrung der beobachteten gegenteiligen Effekte von Phe auf die Verzweigung führte. Im Soma nahen Dendritenabschnitt war eine tendenzielle Erhöhung, im distalen eine tendenzielle Reduzierung der Verzweigung zu sehen. Der dosisabhängige Effekt von Phe ist für den proximalen Dendritenbereich nur teilweise zu finden. Wie erwartet führte die Behandlung mit 2 mM Phe zu keiner Änderung in der proximalen Dendritenanzahl. Die Behandlung mit 1 mM Phe führte ebenso wenig zu einer Änderung der proximalen Dendriten. Die gesteigerte Verzweigung ist auf den distalen Dendritenbereich begrenzt. Anders verhält es sich nach Behandlung der hippocampalen Neurone mit 5 mM Phe. Die Behandlung führte nicht nur zu einer reduzierten Verzweigung im distalen Abschnitt, sondern auch zu einer signifikant reduzierten Anzahl an Primär- und Sekundärdendriten. Phe hat in hohen Konzentrationen nicht nur einen hemmenden Einfluss auf die Verzweigung hippocampaler Dendriten, sondern auch auf das Entstehen eben dieser. Bei Konzentrationen von 1 mM kann der hemmende Einfluss der Aminosäure Phe durch die erhöhte Verzweigung kompensiert werden. Konzentrationen von 2 mM Phe können diese Kompensation nicht mehr auslösen, führen aber noch nicht zu einer Abnahme des Wachstums, wie wir es für Konzentrationen wie 5 mM Phe zeigen konnten.

Das Axon ist für die Weiterleitung der Information aus dem Soma hin zum nächsten Neuron elementar. Im Unterschied zu den Dendriten ist das Axon für die Abgabe der Informationen verantwortlich (Low and Cheng, 2006). Das Axon kann bis zu 1 m lang werden und erreicht somit weit entfernte Zellen. Im Mausmodell des fragilen X-Syndroms konnte gezeigt werden, dass es zu einer verlängerten Erregung entlang des Axons und in der Folge zu einer gesteigerten präsynaptischen Neurotransmitterfreisetzung kommt. Dies führte zu einer Überstimulierung der Neurone (Deng et al., 2013).

Um einen möglichen Einfluss von Phe auf die Entwicklung des Axons zu zeigen, wurden hippocampale Dispersionskulturen mit Phe behandelt und das Axon nach einer Differenzierungszeit von 3 Tagen vermessen. Es konnte kein Unterschied in der Axonlänge nach Behandlung mit Phe festgestellt werden. Phe führte auch in hohen

Konzentrationen nicht zu einem reduzierten Wachstum des Axons, wie es bei den Dendriten zu sehen ist.

Der Informationsaustausch zwischen den Neuronen findet über Synapsen statt. Den postsynaptischen Teil bilden die Spines. Bei diesen handelt es sich um sehr mobile Strukturen, die je nach Morphologie unterschiedliche Funktionen haben. Aus den Dendriten entspringen zuerst die Filopodien. Bei ihnen handelt es sich um lange dünne Ausläufer, die sich sowohl zu einem Dendriten als auch zu einem Spine entwickeln können (Dailey and Smith, 1996). Aus den Filopodien entwickelt sich zuerst der immature Spine. Er besitzt einen langen Hals und einen kleinen Kopf, mit einer kleinen postsynaptischen Dichte, die noch keine AMPA Rezeptoren enthält. Der immature Spine ist anfällig für Um- und Abbauprozesse. Wird der Spine durch Lernprozesse gestärkt, entsteht ein sogenannter ‚mushroom‘ Spine. Dieser mature Spine besitzt eine starke postsynaptische Dichte, eingebaute AMPA Rezeptoren und kann Tage bis Jahre als so genannter Gedächtnisspine bestehen bleiben. Eine weitere, relativ unbekannt Kategorie bilden die ‚branched‘ Spines, die mehrere Köpfe an einem Hals besitzen. Da an den Spines die Informationsaufnahme stattfindet, sind sie bei vielen Erkrankungen mit mentaler Retardierung in ihrer Anzahl und/oder Morphologie verändert (Huttenlocher, 1970). Im Cortex einer 18 Monate alten DS Patientin wurde eine erhöhte Spinedichte bei gleichzeitiger Abnahme der Spinehals-Länge beobachtet (Marin-Padilla, 1972). Ein Neugeborenes mit Trisomie 13 hingegen zeigte eine reduzierte Spinedichte bei gleichzeitiger Zunahme der langen dünnen Spines (Marin-Padilla, 1972). In einem PKU Rattenmodell (Phenylacetat-Injektionen) konnte ein Anstieg der Spines in der CA1 Region des Hippocampus gezeigt werden (Lacey, 1984).

Um einen direkten Einfluss von Phe auf die Ausbildung der Synapsen zu untersuchen, wurden in der hippocampalen Dispersionskultur die postsynaptisch lokalisierten Spines nach Behandlung mit Phe analysiert. Behandlung mit 2 mM und 5 mM Phe führte zu einer signifikant erhöhten Spinedichte in den hippocampalen Kulturen. Verursacht wurde der Anstieg durch die signifikant erhöhte Anzahl der immaturen Spines und der ‚branched‘ Spines (Horling and Schlegel et al., 2014). Die Anzahl an Filopodien und maturen Spines war nach Phe-Behandlung unverändert. Bei der Zunahme handelt es sich um die immaturen Spines und die ‚branched‘ Spines, die beide nicht an Lernprozessen und der Gedächtnisbildung beteiligt sind. Der gefundene Anstieg der

## Diskussion

Spinedichte kann durch einen kompensatorisch bedingten Mechanismus der Zelle begründet sein. Durch das Anlegen einer erhöhten Anzahl immaturer oder perforierter Spines kann die Zelle neue Synapsen ausbilden und so die neuronale Aktivität steigern.

In der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus, dem Mausmodell der humanen Erkrankung PKU, konnte in der CA1 und der CA3 Region des Hippocampus eine erhöhte Anzahl an Synapsen in adulten, 12 Wochen alten Tieren gezeigt werden. Die Analyse der Synapsendichte zu unterschiedlichen Differenzierungszeitpunkten zeigte ein gestörtes synaptisches Pruning für die *Pah<sup>enu2</sup>* Maus (Horling and Schlegel et al., 2014). Durch das fehlende Pruning kommt es zu einem Anstieg nicht funktionierender Synapsen (Lichtman and Colman, 2000). Dies konnte für die *Pah<sup>enu2</sup>* Maus mittels elektrophysiologischer Messverfahren deutlich gezeigt werden (Horling and Schlegel et al., 2014).

Um einen direkten Phe-Einfluss auf die Entwicklung der Synapsen zu sehen, wurden organotypische hippocampale Gewebekulturen mit Phe behandelt. In diesen Gewebekulturen bleibt die Struktur und der Gewebeverband des Hippocampus bestehen (Stoppini et al., 1991). Die Spinesynapsen wurden anschließend stereologisch ausgezählt. Interessanterweise zeigte Phe einen regionsspezifischen Einfluss auf die Synapsendichte. In der CA1 Region führte Phe in allen eingesetzten Konzentrationen zu einer signifikant reduzierten Anzahl an Synapsen. In der CA3 Region hingegen führten höhere Konzentrationen mit 2 mM und 5 mM Phe, zu einer signifikant erhöhten Anzahl an Synapsen und einer unveränderten Anzahl unter Behandlung mit 1 mM Phe. Der regionsspezifische Unterschied kann durch die unterschiedlichen, afferenten Fasern erklärt werden. Synapsen in der CA3 Region erhalten ihren Input aus dem entorhinalen Cortex, wohingegen die Synapsen aus der CA1 Region ihren Input von den Moosfasern der CA3 Pyramidenzellen erhalten, die durch die Phe-Behandlung in ihrer präsynaptischen Funktion eingeschränkt sind. Die gesteigerte Anzahl an Synapsen korreliert dabei nicht zwangsläufig mit der gesteigerten Anzahl funktionierender Synapsen. Vielmehr kann die erhöhte Anzahl in der CA3 Region, wie auch die erhöhte Spinedichte in der hippocampalen Dispersionskultur, auf kompensatorische Mechanismen zurückzuführen sein.

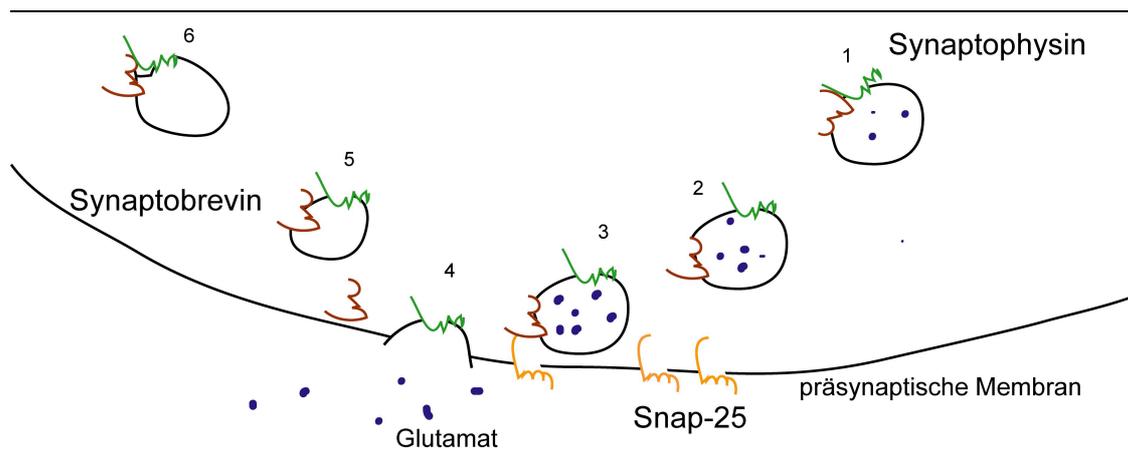
Ein weiterer Faktor der berücksichtigt werden muss, ist die Bildung neuer Dendritenverzweigungen und Synapsen in hippocampalen organotypischen Gewebekulturen nach einer Kulturzeit von 2 Wochen und länger (Dailey and Smith,

1996). Durch die Hemmung des Dendritenwachstums mittels erhöhter Phe-Konzentrationen kann eine gesteigerte Synapsenbildung nicht stattfinden. Dies kann die vermeintlich reduzierte Anzahl an Synapsen in der CA1 Region nach Behandlung mit Phe erklären.

Zusammenfassend kann die Frage nach einem direkten Einfluss von Phe auf die Entwicklung der hippocampalen Neurone eindeutig beantwortet werden. Ja, die Aminosäure besitzt einen direkten, dosisabhängigen Einfluss auf die Entwicklung der Dendriten und die Ausbildung der synaptischen Kontaktstellen. Phe besitzt jedoch im Gegensatz zu seinem Einfluss auf die Dendriten, keinen hemmenden Einfluss auf die Ausbildung und frühe Entwicklung des Axons. Der Einfluss von Phe auf das Axon zu späteren Differenzierungszeitpunkten sollte in weiteren Experimenten geklärt werden.

### **3.2 Phenylalanin beeinflusst die Expression präsynaptischer Proteine**

An der Vesikelfreisetzung und der daraus resultierenden Signalweiterleitung von einem Neuron auf das Nächste sind verschiedene präsynaptisch lokalisierte Proteine beteiligt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine Snap-25, Synaptobrevin und Synaptophysin untersucht. Wie in Abbildung 3-1 dargestellt, interagieren die Proteine miteinander und regulieren die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat. Synaptophysin ist in der Vesikelmembran verankert und bildet mit Synaptobrevin einen Komplex (Becher et al., 1999). Dieser Komplex führt zu einer Vesikelbiogenese (Bonanomi et al., 2007). Synaptische Aktivität in Form intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Erhöhung, vermittelt die Bildung des SNARE-Komplexes (Chen et al., 1999) und die daran anschließende Verschmelzung der Vesikelmembran mit der präsynaptischen Membran wodurch es zur Exozytose der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt kommt. Der SNARE-Komplex entsteht durch Bindung von Synaptobrevin an das in der präsynaptischen Membran verankerte Snap-25 (Bennett, 1995). Nach der Exozytose der Neurotransmitter kommt es zum Recycling der Vesikel. Synaptophysin sorgt dabei für die Wiederaufnahme von Synaptobrevin an die Vesikelmembran (Pennuto et al., 2003).



**Abbildung 3-1: Präsynaptische Neurotransmitterfreisetzung**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Synaptophysin- und Snap-25-Expression in der hippocampalen Dispersionskultur nach Behandlung mit Phe signifikant reduziert ist. Die Synaptobrevinexpression hingegen ist nach Behandlung mit 1 mM Phe signifikant erhöht, bleibt nach Behandlung mit 2 mM und 5 mM Phe jedoch unverändert. Auch in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus konnte die verringerte Expression der Proteine Synaptophysin und Snap-25 gezeigt werden (Horling and Schlegel et al., 2014). Die Arbeitsgruppe Alder et al. konnte zeigen, dass die Blockierung des Proteins Synaptophysin zu einer verminderten, Überexpression dagegen zu einer gesteigerten präsynaptischen Transmitterfreisetzung führt (Alder et al., 1995). Die gefundene reduzierte Synaptophysinexpression lässt auf eine reduzierte Anzahl präsynaptischer Vesikel schließen, was wiederum eine verringerte präsynaptische Transmitterfreisetzung nahe legt. Bestätigt wird dieser Verdacht durch die gemessene, signifikant reduzierte ‚paired-pulse Facilitation‘ in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus (Horling and Schlegel et al., 2014). Die Messung spiegelt das Maß präsynaptisch bereitgestellter Vesikel wieder (Dobrunz and Stevens, 1997). Die in der hippocampalen Dispersionskultur nach Behandlung mit 1 mM Phe gefundene Steigerung der Synaptobrevinexpression kann als kompensatorische Expressionssteigerung zur gesteigerten Bildung von Vesikel verstanden werden. Die reduzierte Expression von Snap-25, sowohl in der hippocampalen Dispersionskultur nach Behandlung mit Phe als auch in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus, bestätigt die Vermutung einer reduzierten Anzahl präsynaptischer Vesikel und daraus resultierender verminderter Transmitterfreisetzung.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Phe direkten Einfluss auf die präsynaptische Transmitterfreisetzung und damit auf die Reizweiterleitung nimmt. In weiterführenden Experimenten sollte der Frage nachgegangen werden, ob durch eine gesteigerte Synaptophysinexpression die Transmitterfreisetzung gesteigert werden kann. Dies würde zudem die Frage beantworten, ob die reduzierte Expression von sowohl Synaptophysin als auch Snap-25 durch das erhöhte Phe oder durch die mangelnde Transmittersynthese und Bereitstellung bedingt ist. Eine weitere Möglichkeit bietet die Quantifizierung der präsynaptisch lokalisierten Vesikel sowie die Bestimmung der Neurotransmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt.

### **3.3 Phenylalanin beeinflusst die postsynaptische Proteinexpression**

In den postsynaptischen Spines sind eine Reihe von Proteinen am Aufbau und Umbau des Zytoskeletts beteiligt. Ein wichtiges Gerüstprotein ist Spinophilin (Feng et al., 2000), welches in den Spines lokalisiert ist und durch seine Bindungsdomänen für die Protein Phosphatase 1 (PP1) und F-Aktin wesentlich zur Regulierung des Aktinzytoskeletts in den Spines beiträgt (Allen et al., 1997). Spinophilin interagiert mit einer Reihe weiterer Proteine (Sarrouilhe et al., 2006). Wie in Abbildung 3-2 dargestellt, interagiert Spinophilin mit dem Guanin-Austausch-Faktor (GEF) Tiam1 und der p70S6 Kinase (S6K) (Sarrouilhe et al., 2006). Die Arbeitsgruppe Buchsbaum et al. konnte zeigen, dass Spinophilin die über Tiam1 und Rac1 vermittelte Aktivierung von Pak1 hemmt (Buchsbaum et al., 2003). Pak1-Aktivierung führt unter normalen Bedingungen zu einem Wachstum der Dendriten (Jacobs et al., 2007).

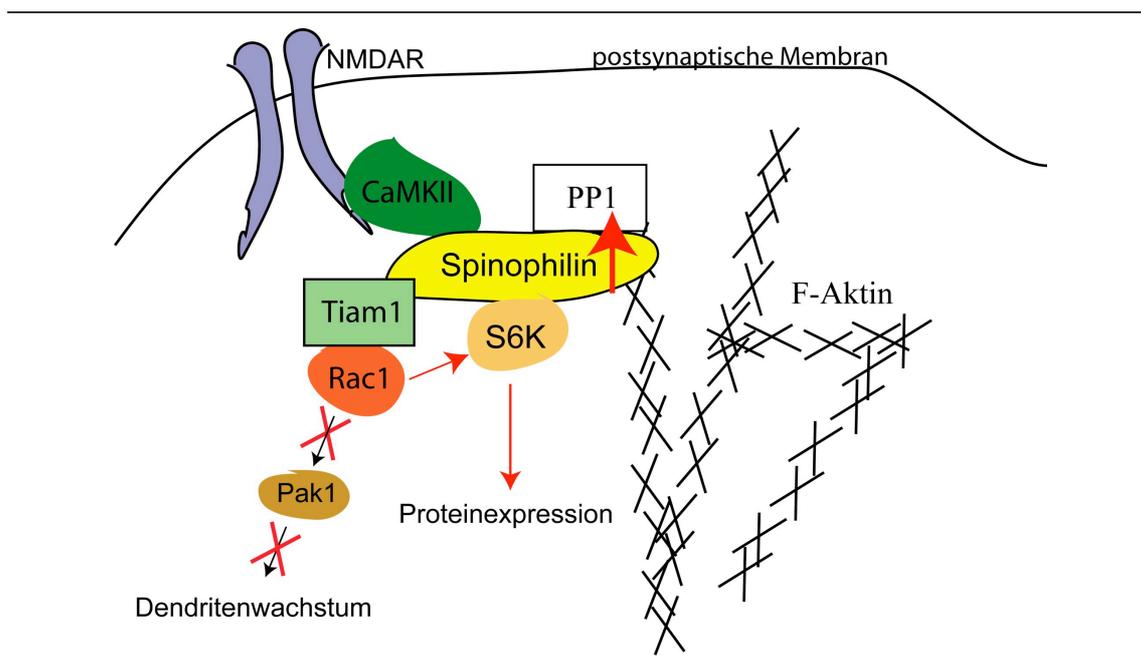


Abbildung 3-2: Spinophilin und sein Einfluss auf das Zytoskelett

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikant erhöhte Spinophilinexpression nach Behandlung hippocampaler Dispersionskulturen mit Phe gezeigt werden. Die erhöhte Expression ist auch im Hippocampus der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus gezeigt worden (Horling and Schlegel et al., 2014). Die erhöhte Spinophilinexpression kann über die Hemmung der Tiam1/Rac1 vermittelten Pak1-Aktivierung zum einen an der reduzierten Dendritenverzweigung der hippocampalen Neurone beteiligt sein, zum anderen kann durch die resultierende Aktivierung der S6 Kinase die gesteigerte postsynaptische Proteinexpression erklärt werden. Zur genaueren Aufklärung des Einflusses und der Ursache der erhöhten Spinophilinexpression sollten Protein-Protein Interaktionsstudien an Phe behandelten hippocampalen Neuronen durchgeführt werden.

Ein weiteres postsynaptisches Protein, welches in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist Synaptopodin. Synaptopodin ist an den Spineapparat assoziiert, welcher im kurzen Hals maturer Spines lokalisiert ist und als interner Kalziumspeicher dient (Segal et al., 2010).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in hippocampalen Dispersionskulturen nach Phe-Behandlung kein Unterschied in der Synaptopodinexpression festgestellt werden. In der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus hingegen konnte eine erhöhte Expression in Hippocampuslysaten gezeigt werden (Horling and Schlegel et al., 2014). Die unveränderte Synaptopodinexpression in den hippocampalen Dispersionskulturen korreliert mit der unveränderten Anzahl maturer Spines, in denen Synaptopodin lokalisiert ist (Vlachos et al., 2009). Der Unterschied zwischen den *in-vivo* und den *in-vitro* Daten ist auf die unterschiedlichen Systeme zurückzuführen. Durch die Wahl des *in-vitro* Modells, besteht die Möglichkeit einer unzureichenden Konnektivität der Neurone untereinander und einer daraus bedingten fehlenden Entwicklung maturer Spines.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Phe in hippocampalen Dispersionskulturen zu einer gesteigerten Spinophilinexpression führt, die Synaptopodinexpression jedoch unverändert bleibt. Phe kann durch das Protein Spinophilin das Zytoskelett und damit die Entwicklung der hippocampalen Neurone beeinflussen und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

### **3.4 Phenylalanin beeinflusst das Aktinzytoskelett**

Wie gerade erwähnt, nimmt Phe Einfluss auf die Ausbildung des Aktinzytoskeletts. Ein Protein, das maßgeblich für die Reorganisation des Aktinzytoskeletts und damit das Dendritenwachstum und die Spinestabilisierung verantwortlich ist, ist Cofilin (Bamburg, 1999). Die Aktinfilamente des Zytoskeletts befinden sich in einem ständigen Auf- und Abbauprozess, der durch das Protein Cofilin vermittelt wird. Cofilin führt zur Depolymerisierung von Aktinmonomeren, die in der Folge für den Einbau an einer anderen Stelle wieder zur Verfügung stehen (Carlier et al., 1997, Meberg et al., 1998). Durch die Phosphorylierung von Cofilin durch die LIMK1 kommt es zur Inaktivierung des Proteins, die Depolymerisierung kann nicht weiter stattfinden (Yang et al., 1998). Das Aktinzytoskelett kann somit nicht weiter umgebaut werden, es stabilisiert sich.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Phe auf das Protein Cofilin in der hippocampalen Dispersionskultur untersucht. Behandlung der hippocampalen Neurone mit 2 mM und 5 mM Phe führte zu einer signifikanten Reduktion der Cofilinexpression. Die Behandlung mit 1 mM Phe hatte keinen Einfluss auf die Expression. Neben der

## Diskussion

Bestimmung der Gesamtexpression wurde zudem die Expression des inaktivierten phosphorylierten Cofilin bestimmt. Lediglich die Behandlung mit 5 mM Phe führte zu einer signifikanten Abnahme der phosphorylierten Form. Behandlung mit 1 mM und auch mit 2 mM Phe hatte keinen Einfluss auf die Expression von p-Cofilin. Durch die verminderte Expression nach Behandlung mit höheren Phe-Konzentrationen können die Aktinfilamente nicht in einem ausreichenden Maß depolymerisiert werden. Obwohl es durch die Behandlung mit 5 mM Phe zu einer vermeintlich reduzierten Inaktivierung des Proteins kommt, ist das Verhältnis von phosphoryliertem Cofilin zum Gesamtcofilin nicht erhöht. Im Falle der Behandlung mit 5 mM Phe erklärt dies die reduzierte Dendritenverzweigung der hippocampalen Neurone. Die signifikant reduzierte Anzahl an Primär- und Sekundärdendriten ist auch auf den Mangel an Cofilin zurückzuführen. Das signifikant erhöhte Verhältnis von p-Cofilin zum Gesamtcofilin nach Behandlung mit 2 mM Phe spiegelt den dosisabhängigen Einfluss der Aminosäure auf die Dendritenverzweigung wieder. Phe reduziert in einer Konzentration von 2 mM zwar nicht die Gesamtexpression, führt aber zu einer verstärkten Inaktivierung und damit zur Hemmung der gesteigerten Dendritenverzweigung, wie es nach Behandlung mit 1 mM Phe gezeigt wurde. Die gesteigerte Dendritenverzweigung nach Behandlung mit 1 mM Phe ist durch die Expression von Cofilin nicht zu erklären. In weiterführenden Experimenten sollte deshalb die Expression von Aktin in hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit Phe untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Untersuchung der Intermediärfilamente und der Mikrotubulibestandteile  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin.

Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit ein Cofilin-,Rescue' durch Kurzzeitstimulation der Neurone mit NMDA erreicht werden. Durch kurzzeitige Erhöhung der synaptischen Aktivität konnte die reduzierte Cofilinexpression nach Behandlung mit 5 mM Phe auf Kontrollniveau gesteigert werden. Durch NMDA verursachte synaptische Aktivität in Form eines gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in die Postsynapse, hebt die Phe-induzierten Effekte auf das Zytoskelett auf. In Folgeexperimenten sollte untersucht werden, ob durch die Behandlung mit anderen aktivitätssteigernden Substanzen wie KCl, die Phe-induzierten Effekte auf die Cofilinexpression ebenfalls kompensiert werden können. Es sollte auch untersucht werden, ob durch die Erhöhung der präsynaptischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mittels

Behandlung durch LiCl (Reuter and Seitz, 1968), eine gesteigerte Vesikelexocytose und damit gesteigerte Neurotransmitterfreisetzung erreicht werden kann.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden dass Phe in höheren Konzentrationen (5 mM) die Expression und Phosphorylierung von Cofilin und dadurch die Ausbildung des Aktinzytoskeletts beeinflusst. Durch Steigerung der synaptischen Aktivität konnte der hemmende Einfluss von Phe aufgehoben werden.

### **3.5 Phenylalanin beeinflusst dosisabhängig den CaMKII-Rac1-vermittelten Signalweg**

Verschiedene Signalwege beeinflussen die Ausbildung des Zytoskeletts. Für den CaMKII-Rac1-vermittelten Signalweg konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Modellen ein Einfluss von Phe auf die einzelnen Elemente, CaMKII oder Rac1, gezeigt werden.

Die Arbeitsgruppe de Freitas et al. konnte im Cortex Phe-behandelter Ratten, eine gesteigerte Phosphorylierung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin sowie einer Neurofilamenuntereinheit zeigen (de Freitas et al., 1997). Sie konnten zudem die direkte Beteiligung des Enzyms CaMKII an der gesteigerten Phosphorylierung sowie den hemmenden Einfluss der erhöhten Phe-Konzentrationen auf die Protein Phosphatase 1 nachweisen (de Freitas et al., 1997). Die Protein Phosphatase 1 (PP1) dephosphoryliert, neben anderen postsynaptisch lokalisierten Proteinen, auch die CaMKII (Shields et al., 1985). Das Enzym CaMKII führt zur Aktivierung vieler Proteine und beeinflusst dadurch eine Reihe von Vorgängen in der Zelle. So konnte im visuellen Cortex eine Abnahme des Dendritenwachstums nach Überexpression gezeigt werden (Wu and Cline, 1998). In maturen Neuronen ist die Expression der CaMKII ebenfalls erhöht, was die weitere Differenzierung stoppt (Kelly and Vernon, 1985).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Phe auf die Expression und Aktivität der CaMKII in hippocampalen Dispersionskulturen bestimmt. Die Behandlung der hippocampalen Neurone mit Phe führte in keiner der gewählten Konzentrationen zu einer veränderten Expression des Proteins. Phe zeigte allerdings einen dosisabhängigen

## Diskussion

Einfluss auf die Aktivität des Enzyms. Behandlung der hippocampalen Neurone mit 5 mM Phe führte zu einer signifikant gesteigerten Expression des phosphorylierten Proteins. Die Behandlung mit 1 mM und 2 mM Phe hatte, wie auch auf die Gesamtexpression, keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms. Das Enzym wird durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom phosphoryliert und kann sich im Anschluss daran autophosphorylieren (Lisman et al., 2002). Wie die Arbeitsgruppe de Freitas et al. zeigen konnte, wird die PP1 durch erhöhte Konzentrationen Phe gehemmt, was zu einer reduzierten Proteindephosphorylierung führt (de Freitas et al., 1997). Dieser Befund kann die in der vorliegenden Arbeit gezeigte gesteigerte p-CaMKII Expression nach Behandlung mit 5 mM Phe erklären. Die gesteigerte Aktivität der CaMKII und die daraus resultierende Hemmung der Differenzierung (Kelly and Vernon, 1985) erklärt das durch die Sholl-Analyse gezeigte reduzierte Dendritenwachstum nach Behandlung der hippocampalen Neurone mit 5 mM Phe.

Wie auch für die Cofilinexpression beobachtet, kommt es durch Kurzzeitstimulation mit NMDA zu einer Aufhebung des Phe-induzierten Effekts. Die durch Phe gehemmte PP1 scheint durch die NMDA-Stimulation und daraus resultierendem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wieder aktiviert zu werden. Zur weiteren Evaluierung sollten Folgeexperimente angeschlossen werden. Zum einen sollte wie bereits für die Cofilinexpression beschrieben, der Einfluss weiterer aktivitätssteigernder Substanzen, wie LiCl, untersucht werden. Zum anderen sollte der Einfluss erhöhter Phe-Konzentrationen auf die PP1 in hippocampalen Neuronen untersucht werden. Behandlung der Neurone mit Phe und zusätzlicher Behandlung mit PP1-Inhibitoren kann Aufschluss über den Einfluss von Phe auf die PP1 geben.

In kultivierten Cortexneuronen konnte ein hemmender Einfluss erhöhter Phe-Konzentrationen auf die GTPase Rac1 gezeigt werden (Zhang et al., 2007). Die Arbeitsgruppe Threadgill et al. konnte in corticalen Neuronen zeigen, dass eine reduzierte Aktivität der GTPase Rac1 einen hemmenden Einfluss auf die Ausbildung der primären Dendriten hat, welcher durch die Expression konstitutiv aktiver Rac1-Mutanten aufgehoben werden konnte (Threadgill et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein dosisabhängiger Effekt der Aminosäure Phe auf die Aktivität von Rac1 gezeigt werden. Die Behandlung mit Konzentrationen von 1 mM und 2 mM Phe, führte zu keiner Veränderung der Rac1-Aktivität. Die Behandlung mit 5

mM Phe hingegen, führte zu einer signifikanten Abnahme der Rac1-Aktivität. Wie auch durch Threadgill et al. beschrieben, führte die Behandlung mit 5 mM Phe nicht nur zu einer reduzierten Rac1-Aktivität, sondern in der Folge auch zu der reduzierten Ausbildung primärer und sekundärer Dendriten.

Die Hypothese zur Beeinflussung des CaMKII-Rac1-Signalwegs als zusammenhängender Signalweg, kann nicht bestätigt werden. Phe hat jedoch einen direkten Einfluss auf beide untersuchten Komponenten dieses Signalwegs. In weiterführenden Experimenten sollte die Beteiligung der Guanin-Austausch-Faktoren, insbesondere die Beteiligung von Tiam1, genauer untersucht werden. Tiam1 wird durch die CaMKII aktiviert und führt dadurch wiederum zur Aktivierung von Rac1 (Fleming et al., 1999). Da Tiam1 jedoch auch an das Protein Spinophilin assoziiert ist, kann dies die fehlende Aktivierung von Rac1, trotz der gesteigerten Aktivierung der CaMKII, erklären (Abbildung 3-2).

### **3.6 Mikroglia sind am verzögerten synaptische Pruning in PKU beteiligt**

Mikroglia sind die Immunzellen des Zentralen Nervensystems und werden durch Pathogene oder Verletzungen aktiviert. Durch die Aktivierung verändern Mikroglia ihre Morphologie und migrieren zum Ort des Geschehens, wo sie die Pathogene zerstören und phagozytieren (Rock et al., 2004). Sie phagozytieren jedoch auch beschädigte Neurone, wodurch ihnen eine nachteilige Wirkung bei Neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Erkrankung, der Parkinson Erkrankung und vielen weiteren zukommt (Benveniste et al., 2001, Gao et al., 2002). Mikroglia werden durch unterschiedliche Cytokine aktiviert. Eine wichtige Rolle spielt zudem der Rezeptor CX3CR1, der exklusiv auf Mikrogliazellen exprimiert (Harrison et al., 1998) und durch den Liganden CX3CL1 aktiviert wird (Kim et al., 2011). Die Arbeitsgruppe Paolicelli et al. konnte die Beteiligung von Mikroglia am synaptischen Pruning im Hippocampus zeigen. Zudem konnten sie zeigen, dass der Rezeptor CX3CR1 für diesen Vorgang elementar ist (Paolicelli et al., 2011). In Mäusen, die den CX3CR1 Rezeptor im Hippocampus nicht exprimieren ( $Cx3cr1^{KO}$ ), konnten sie eine erhöhte Spinedichte in der CA1 Region im Vergleich zu Kontroll-Tieren messen. Durch den CX3CR1 Verlust kam es in der CA1 Region zudem zu einer verminderten Mikroglia-proliferation. Die

Arbeitsgruppe Schafer et al. konnte zeigen, dass die Aktivierung von Mikroglia und das daraus resultierende synaptische Pruning auch vom CR3/C3-Signalweg und damit komplementabhängig ist (Schafer et al., 2012). Der Komplementfaktor C3 befindet sich in Mikrovessikeln (Exosomen), die durch glutamaterge Aktivität freigesetzt werden (Lachenal et al., 2011). Die Arbeitsgruppe Bahrini et al. konnte sehr eindrucksvoll die Beteiligung des Komplementfaktors C3 beim Mikroglia-vermittelten synaptischen Pruning zeigen (Bahrini et al., 2015). Durch die Freisetzung des in Exosomen lokalisierten Komplementfaktors C3 aus PC12 Zellen wurde die C3 Expression in den Mikrogliazellen gesteigert, was in der Folge zu einer erhöhten Aktivität der Mikroglia führte (Bahrini et al., 2015). In den Hippocampi von *Pah<sup>enu2</sup>* Mäusen wurde die Synapsendichte zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten bestimmt. In 2 Wochen alten Tieren konnte im Vergleich zu den WT-Tieren kein Unterschied in der Anzahl der Synapsen festgestellt werden. Bei den WT-Tieren kam es ab einem Alter von 4 Wochen bis zu einem Alter von 12 Wochen zu einem physiologischen Rückgang der Synapsen. Dieser Rückgang, das synaptische Pruning konnte in den *Pah<sup>enu2</sup>* Mäusen nur abgeschwächt und mit einem verspäteten Start gezeigt werden (Horling and Schlegel et al., 2014). Dies resultierte in einer gesteigerten Anzahl an Synapsen in den 12 Wochen alten *Pah<sup>enu2</sup>* Mäusen.

In der vorliegenden Arbeit konnte in den Hippocampi 12 Wochen alter *Pah<sup>enu2</sup>* Mäuse eine signifikant reduzierte Mikrogliaaktivität gezeigt werden. In den Hippocampi 2 Wochen alter *Pah<sup>enu2</sup>* Mäuse hingegen konnte kein Unterschied in der Aktivität der Mikroglia festgestellt werden (Horling and Schlegel et al., 2014). Die Untersuchungen zeigen deutlich die Beteiligung der Mikroglia am synaptischen Pruning. Die erhöhte Anzahl an Synapsen in den 12 Wochen alten *Pah<sup>enu2</sup>* Mäusen wird von einer reduzierten Mikrogliaaktivität begleitet. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse der mRNA aus den Hippocampi der 12 Wochen alten Tiere zeigte eine signifikante Reduktion der C3 und CX3CR1 mRNA. In weiterführenden Experimenten sollte die Proteinexpression von C3 und CX3CR1 im Hippocampus der Tiere untersucht werden. Interessant ist auch die Frage nach der Lokalisation des C3 Proteins. Ist die Expression von C3 in den Neuronen und damit die Menge in den Exosomen reduziert? Kommt es trotz einer ausreichenden Expression in den Neuronen durch die mangelnde neuronale Aktivität zu einer verminderten Freisetzung der C3 gefüllten Exosomen? Und führt dies in der Folge zu einer verminderten Expression von C3 in den Mikroglia? ‚Rescue‘-

Experimente mit konstitutiv aktiven C3 und/oder CX3CR1 Plasmiden können einen weiteren Aufschluss über das zelluläre Geschehen geben und sollten in organotypischen Gewebekulturen durchgeführt werden.

Zur Klärung der Frage eines direkten Einflusses der Aminosäure Phe auf die Aktivität der Mikroglia, wurde die Aktivität in hippocampalen Gewebekulturen nach Behandlung mit Phe untersucht. Es konnte kein Einfluss von Phe auf die Aktivität der Mikroglia in den Gewebekulturen gezeigt werden. Die Bestimmung der Synapsendichte nach Behandlung mit Phe zeigte einen regionsspezifischen Einfluss der Aminosäure. In der CA3 Region führte die Behandlung mit Phe zu einer erhöhten Synapsendichte, in der CA1 Region hingegen zu einer verringerten. Trotz dieser Ungleichheiten, ist kein Unterschied in der Aktivität der Mikrogliazellen festzustellen. In weiterführenden Experimenten sollten zuerst die C3 und CX3CR1 mRNA-Level nach Behandlung mit Phe in den hippocampalen Gewebekulturen gemessen werden. Auch die Proteinexpression von C3 und CX3CR1 sollte in den organotypischen Kulturen untersucht werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden dass Mikroglia am synaptischen Pruning in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus beteiligt sind und dass es zu einer veränderten C3 und CX3CR1 mRNA in den Tieren kommt. Es konnte auch gezeigt werden, dass Phe keinen direkten Einfluss auf das Mikroglia-spezifische, aktivitätsabhängig exprimierte Protein Iba-1 und damit auf die Aktivität von Mikroglia besitzt.

### **3.7 Zusammenfassung**

*In-vitro* Untersuchungen zeigten einen dosisabhängigen Effekt der Aminosäure Phe auf die Entwicklung und Differenzierung von Dendriten und Spines hippocampaler Neurone. Die Behandlung führte außerdem zu einer Änderung der Expression prä- und postsynaptischer Proteine. Die Untersuchungen des Proteins Cofilin, welches an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt ist, zeigten ebenfalls einen dosisabhängigen Effekt der Aminosäure. Die genauere Analyse eines Signalweges, der die gefundenen, morphologischen Veränderungen vermittelt, konnte einen dosisabhängigen Effekt der Aminosäure auf die untersuchten Proteine zeigen. Die

## Diskussion

Beteiligung als durch Phe beeinflusster, zusammenhängender Signalweg konnte durch die Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden.

Untersuchungen in hippocampalen Gewebekulturen zeigten einen regionsspezifischen Einfluss der Aminosäure auf die Synapsendichte. Die Untersuchungen des Einflusses von Phe auf die Aktivität der Mikrogliazellen konnte die direkte Beteiligung von Phe an der Aktivierung ausschließen.

*In-vivo* Untersuchungen in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus zeigten sehr deutlich die Beteiligung von Mikrogliazellen am veränderten synaptischen Pruning. Eine Veränderung in der mRNA des Komplementfaktors C3 sowie des Mikroglia-spezifischen Rezeptors CX3CR1 konnte für die *Pah<sup>enu2</sup>* Maus ebenfalls gezeigt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt wie komplex die durch Phe beeinflussten Mechanismen sind. Phe führt nicht nur über den direkten Weg zu Veränderungen der hippocampalen Entwicklung, sondern greift an unterschiedlichsten Stellen direkt oder indirekt in das zelluläre Geschehen ein. Ein wichtiger Aspekt, der maßgeblich an der Entstehung der mentalen Retardierung beteiligt ist, ist die reduzierte neuronale Aktivität, die wir in der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus durch verschiedene Experimente zeigen konnten (Horling and Schlegel et al., 2014). Ein weiterer, wichtiger und vollkommen neuer Aspekt, ist die Beteiligung des Komplementsystems und der Mikrogliazellen bei PKU. Insgesamt verdeutlicht und untermauert diese Arbeit die Notwendigkeit einer lebenslangen Phe-reduzierten Diät.

## 4 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und angewandten Methoden sind im Folgenden Kapitel erläutert.

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Versuchstiere

Alle in dieser Arbeit verwendeten Ratten und Mäuse entstammen der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Tiere wurden in einem konstanten Tag-Nacht Zyklus gehalten, mit Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*.

Für die hippocampalen Dispersionskulturen wurden Rattenembryonen aus schwangeren Wistar Ratten am Embryonaltag 18 (E18) entnommen. Die Muttertiere wurden dafür mit CO<sub>2</sub>/ O<sub>2</sub> und anschließend mit reinem CO<sub>2</sub> narkotisiert und zur Entnahme der Embryonen dekapitiert.

Organotypische, hippocampale Gewebekulturen wurden von 5 Tage (P5) alten C57Bl/6J Mäusen angefertigt. Die Mäuse wurden dekapitiert und die Hippocampi aus den Gehirnen präpariert.

Die Untersuchungen an den Hippocampi von *Pah<sup>enu2</sup>* C57Bl/6J Mäusen und deren WT-Geschwister wurden an unterschiedlichen Altersstufen durchgeführt. Die Mäuse wurden per Genickbruch getötet und die Hippocampi aus den Gehirnen separiert.

#### 4.1.2 Zellkultur

In dieser Arbeit kam folgende Zelllinie zum Einsatz:

<b>HEK293</b>	humane embryonale Nierenzelllinie (Graham et al., 1977)
---------------	---

**Tabelle 4-1: Zelllinien**

### 4.1.3 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 2-1 und Tabelle 4-3 zusammengefasst.

	<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Quelle</b>	<b>Art</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>anti-CaMKII</b>	CaMKII	Kaninchen	Abcam	monoklonal	1:500 (IC)
<b>anti-pCaMKII</b>	T-268-p-CaMKII	Maus	Abcam	monoklonal	1:500 (IC)
<b>anti-Cofilin</b>	Cofilin	Kaninchen	Santa Cruz	monoklonal	1:500 (WB)
<b>anti-p-Cofilin</b>	Ser-3 p-Cofilin	Kaninchen	Santa Cruz	monoklonal	1:200 (WB)
<b>anti-GFP</b>	GFP	Kaninchen	Abcam	monoklonal	1:2500 (IC)
<b>anti-HA</b>	Hämagglutinin	Maus	Santa Cruz	monoklonal	1:500 (WB)
<b>anti-MAP2</b>	MAP2	Kaninchen	Millipore	polyklonal	1:1000 (IC)
<b>anti-Rac1</b>	Rac1	Maus	Cytoskeleton	monoklonal	1:500 (WB)
<b>anti-smi312</b>	Neurofilament	Maus	Abcam	monoklonal	1:1000 (IC)
<b>anti-Snap-25</b>	Snap-25	Kaninchen	Abcam	polyklonal	1:500 (IC)
<b>anti-Spinophilin</b>	Spinophilin	Kaninchen	Sigma	polyklonal	1:500 (IC)
<b>anti-Synaptobrevin</b>	Synaptobrevin	Kaninchen	Abcam	polyklonal	1:500 (IC)
<b>anti-Synaptopodin</b>	Synaptopodin	Kaninchen	SYSY	polyklonal	1:500 (IC)
<b>anti-Synaptophysin</b>	Synaptophysin	Maus	Millipore	monoklonal	1:500 (IC)
<b>anti-<math>\alpha</math>-Tubulin</b>	$\alpha$ -Tubulin	Maus	Sigma	monoklonal	1:10000 (WB)
<b>anti-Iba-1</b>	Iba-1	Kaninchen	Wako	polyklonal	1:800 (IHC)

**Tabelle 4-2: Eingesetzte Primärantikörper und ihre Verdünnungen**

Bezeichnung	Antigen	Spezies	Quelle	Verdünnung
Alexa488 goat anti-rabbit	Kaninchen IgG	Ziege	Molecular Probes	1:250 (IC)
Alexa488 chicken anti-rabbit	Kaninchen IgG	Huhn	Molecular Probes	1:250 (IC)
Alexa488 goat anti-maus	Maus IgG	Ziege	Molecular Probes	1:350, 1:500 (IC)
CY3 donkey anti- rabbit	Kaninchen IgG	Esel	Jackson Immuno Research	1:350 (IC)
CY3 goat ant-rabbit	Kaninchen IgG	Ziege	Jackson Immuno Research	1:350, 1:500 (IC, IHC)
CY3 goat anti-maus	Maus IgG	Ziege	Jackson Immuno Research	1:250 (IC)
peroxidase- conjugated donkey anti-rabbit IgG	Kaninchen IgG	Esel	Abcam	1:2500 (WB)
peroxidase- conjugated goat anti- mouse IgG	Maus IgG	Ziege	Jackson Immuno Research	1:2500 (WB)
peroxidase- conjugated donkey anti-mouse IgG	Maus IgG	Esel	Jackson Immuno Research	1:2500 (WB)

Tabelle 4-3: Eingesetzte Sekundärantikörper und ihre Verdünnungen

#### 4.1.4 Bakterienstämme

Für die Expression von Fusionsproteinen und die Klonierung von DNA-Fragmenten wurden die in Tabelle 4-4 aufgeführten *Escherichia coli* Stämme verwendet.

Bakterienstamm	Genotypische Merkmale
XL 1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F <sup>'</sup> proAB lacIqZΔM15TN10(Tetr)]
BL21 (DE3)	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5

Tabelle 4-4: Bakterienstämme

### 4.1.5 Vektoren

Für die Transfektion kultivierter, hippocampaler Neurone wurde das Plasmid pEGFP-N1 der Firma Clontech verwendet. Es enthält einen GFP-tag (grün fluoreszierendes Protein), welches nach Transfektion ubiquitär in den Zellen exprimiert wird. Für die Transfektion von HEK-293 Zellen wurde das pCDNA3-1+HA-Plasmid verwendet, welches einen HA-tag (Hämagglutinin) besitzt. Dieser kann nach erfolgreicher Transfektion mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Das Plasmid wurde für Kontrollexperimente in HEK-293 Zellen genutzt. Für die Überexpression rekombinanter Proteine in Bakterienzellen wurde das Plasmid pGEX-4T1 verwendet. Es enthält einen tac-Promotor, der durch IPTG reguliert werden kann, gefolgt von einem GST-tag und der Bindungsdomäne für GTP-gebundenes Rac1 (Pak1).

### 4.1.6 Oligonukleotide

Alle eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 4-5 aufgelistet. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurofins MWG (Ebersberg) oder Invitrogen (Darmstadt) bezogen.

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')
<b>18S</b>	fw: AGAAACGGCTACCACATCCAA rv: CCTGTATTGTTATTTTCGTCACTACCT
<b>HPRT</b>	fw: CAAACTTTGCTTCCCTGGT rv: CAAAGTCTGGCCTGTATCCAA
<b>PAH</b>	fw: CTTGTACTGGTTTCCGCCTCC rv: CCAGCCTGCAATGAGCCTGATC
<b>T7</b>	rv: TAATACGACTCACTATAGGG

Tabelle 4-5: Oligonukleotide mit Sequenzen

### 4.1.7 Restriktionsenzyme

Eingesetzte Restriktionsenzyme sind in Tabelle 4-6 aufgeführt. Alle verwendeten Enzyme wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen.

Enzym	Anwendung
BamHI, NotI, NheI	Verdau Plasmide
Alw26i	Genotypisierung

Tabelle 4-6: Enzyme und ihre Verwendung

#### 4.1.8 Größenstandards

Die Größenstandards sind in Tabelle 4-7 aufgelistet und wurden von der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) bezogen.

	Bezeichnung	Größenauftrennung
<b>Nukleinsäuren</b>	GeneRuler 50bp DNA Ladder	1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp
<b>Protein</b>	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 kDa

Tabelle 4-7: Größenstandards

#### 4.1.9 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle eingesetzten Chemikalien stammen, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), AppliChem (Darmstadt), VWR (Darmstadt), Thermo Scientific (USA) oder Merck (Darmstadt).

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur sowie für das molekularbiologische und biochemische Arbeiten wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner (Solingen), Millipore (Schwalbach), Sarstedt (Nümbrecht), Nunc (Wiesbaden), BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, USA), Assistent (Sondheim) und Marienfeld (Lauda-Königshofen) bezogen.

#### 4.1.10 Kits

Eingesetzte Kits sind in Tabelle 4-8 zu finden.

	<b>Anwendung</b>
<b>HiSpeed® Plasmid Purification (Qiagen)</b>	Plasmid-Präparation
<b>RNeasy Mini Kit (Qiagen)</b>	RNA Extraktion
<b>In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche)</b>	Apoptosenachweis
<b>Extract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma)</b>	Genotypisierung
<b>RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen)</b>	cDNA Synthese
<b>Effectene Transfection Reagent (Qiagen)</b>	Transfektion

Tabelle 4-8: Angewendete Kits

#### 4.1.11 Geräte

Alle benötigten Geräte sind in Tabelle 4-9 aufgelistet.

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung und Hersteller</b>
<b>Agarose-Gelelektrophoresesystem</b>	Sub-Cell GT, BioRad, München
<b>Binokular</b>	Stemi SV11, Zeiss, Jena Stemi DV4, Zeiss, Jena
<b>Blot Module</b>	XCell II, Invitrogen, USA
<b>Chemilumineszenzkamera</b>	Fusion SL2, Vilber Lourmat, Eberhardzell
<b>CO<sub>2</sub>-Inkubatoren</b>	CB, Binder, Tuttlingen Heraeus Function Line, Heraeus, Hanau
<b>Digitale Kamera</b>	AxioCam HRc, Zeiss, Jena Quemesa, Olympus, Münster
<b>Elektrophoresesystem</b>	XCell <i>SureLock</i> Mini-Cell, Invitrogen, USA
<b>Geldokumentationssystem</b>	BIO-Print M1, Vilber Lourmat, Eberhardzell
<b>Heizblock</b>	VLM 2Q, Gefran

<b>Inkubatoren</b>	Memmert, Schwabach Melag Brutschrank Typ A, Melag, Berlin
<b>Kryostat</b>	Microm HM560, Microm, Walldorf
<b>Lichtmikroskope</b>	PrimoVert, Zeiss, Jena CH40, Olympus, Münster
<b>Microtom</b>	Reichert Jung Supercut 2050
<b>Mikroskope</b>	Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2, Zeiss, Jena Fluoreszenzmikroskop BZ-9000, Keyence, Neu-Isenburg konfokales Laser Scanning Mikroskop, LSM, Axiovert 100 Microsystem, Zeiss, Jena
<b>Netzgeräte</b>	LKB GPS200/400, Pharmacia Biotech, UK Consort, Peqlab, Erlangen
<b>Photometer</b>	Bio Photometer, Eppendorf, Hamburg Ultrospec 3000 UV/Vis Photometer, Pharmacia Biotech, UK
<b>Real-Time PCR System</b>	StepOnePlus™, Applied Biosystems, Darmstadt
<b>Rotatoren</b>	MacsMix Tube Rotator, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach Stuart Rotator SB3, Bibby Scientific, UK VWR Tube Rotator, VWR, Hannover
<b>Scanner</b>	HP Scanjet 8300, hp, USA
<b>Schüttelinkubator</b>	Multitron II, Infors HT, Schweiz
<b>Schüttler</b>	Celloshaker Variospeed, Chemetron, USA
<b>Sterile Werkbänke</b>	Hera Safe, Heraeus, Hanau
<b>Thermocycler</b>	Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg T personal, Biometra, Göttingen
<b>Tissue Chopper</b>	McILWAIN, H. Sauer Laborbedarf, Reutlingen
<b>Transmissions- elektronenmikroskop</b>	CM 100, Philips
<b>Ultramicrotom</b>	Reichert Jung Ultracut
<b>Ultraschallgerät</b>	Sonifier B-12, Branson, Emerson, USA
<b>Vortexer</b>	Vortex Genie2; Scientific Industries, USA
<b>Waagen</b>	Analysenwaage Sartorius AG, Göttingen

<b>Zentrifugen</b>	Eppendorf Centrifuge 5417R und 5414, Eppendorf, Hamburg Heraeus Minifuge GL, Heraeus, Hanau Universal 32R Hettich Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen
--------------------	---

**Tabelle 4-9: Benötigte Geräte**

#### 4.1.12 Software

Verwendete Softwareprogramme sind in Tabelle 4-10 zusammengefasst.

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
<b>AxioVision 3.1</b>	Zeiss
<b>Bio CAPT</b>	Vilber Lourmat
<b>EndNote X3</b>	Thomson Reuters
<b>Excel 2003, Word 2003</b>	Microsoft
<b>Fusion CAPT</b>	Vilber Lourmat
<b>ImageJ Version 1.440</b>	NIH
<b>iTEM</b>	Olympus
<b>Photoshop CS3, Illustrator CS3</b>	Adobe
<b>SPSS Statistics 20</b>	IBM
<b>StepOne™ Software v2.2.2</b>	Applied Biosystems
<b>ZEN 2011</b>	Zeiss

**Tabelle 4-10: Eingesetzte Software**

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellbiologische Methoden

Je nach Fragestellung kamen verschiedene Zellkultursysteme zum Einsatz, die im Folgenden erläutert werden sollen.

#### 4.2.1.1 Primäre hippocampale Dispersionskultur

Nach Dekapitation der Embryonen und Isolation des Großhirns wurden die Meningen abpräpariert und die Hemisphären sagittal geteilt. Aus beiden Hemisphären wurde der Hippocampus freigelegt und in HBSS aufgenommen. Durch Zugabe von 10 ml Trypsinlösung wurde der Gewebeverband bei 37 °C für 20 min verdaut (Brewer, 1997). Anschließendes viermaliges Waschen mit HBSS diente der Inaktivierung und Entfernung überschüssigen Enzyms. Zur Herstellung einer homogenen Dispersion wurden die Hippocampi im Platierungsmedium aufgenommen und mit feuerpolierten Pasteurpipetten in absteigender Größe trituriert. Nicht vereinzelt Zellen wurden durch Überführung der Suspension in ein neues 50 ml Röhrchen über ein Zellsieb der Porengröße 40 µm entfernt. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte in einer Neubauer Zählkammer. Die Zellen wurden in Poly-L-Lysin beschichtete 24-Well- oder 6-Well-Platten mit einer Dichte von 75.000 bzw. 375.000–450.000 Zellen pro Well ausplattiert. Nach erfolgreicher Adhärenz der Zellen wurde das Platierungsmedium mit vorgewärmten PBS entfernt und die Zellen mit erwärmtem Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

<b>HBSS</b>	50 ml 10x HBSS (ohne Calcium und Magnesium, Gibco) 5,04 ml 1 M HEPES (Sigma) Aq. dest. ad 500 ml ph = 7,3; sterilfiltrieren
<b>Trypsinlösung</b>	2 ml Trypsin/EDTA (0,25 %/ 0,02 % (w/v), Gibco) 8 ml HBSS (Gibco)
<b>Platierungsmedium</b>	43 ml MEM (Gibco) 5 ml Pferdeserum (Gibco) 500 µl 100x Penicillin/Streptomycin (Gibco) 1,5 ml 20 % Glucoselösung (Endkonzentration 0,6 %) sterilfiltrieren
<b>Poly-L-Lysin</b>	100 mg Poly-L-Lysin (Sigma) ad 100 ml mit 100 mM Boratpuffer ph = 8,5; sterilfiltrieren
<b>Kulturmedium</b>	50 ml Neurobasal A (Gibco) 500 µl 50x B27 (Gibco) 125 µl 200 mM L-Glutamin (Gibco) 500 µl 100x Penicillin/ Streptomycin (Gibco)

## Material und Methoden

### PBS

8,8 g Natriumchlorid (NaCl)
0,27 g Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ )
1,4 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )
Aq. dest. ad 1 l, ph = 7,4; autoklavieren

### 4.2.1.2 Hippocampale organotypische Gewebekultur

Die Hippocampi wurden mit einem Tissue Chopper in 375  $\mu\text{m}$  dünne Gewebescheiben geschnitten. Unter dem Mikroskop wurden die Gewebeschnitte, im Präparationsmedium schwimmend, voneinander separiert. Jeweils 8 aufeinander folgende Gewebescheiben wurden alternierend auf zwei MiliCell® Membranen ausgerichtet. Durch die hohe Biokompatibilität der Membranen richtet sich das entnommene Gewebe ohne weitere Beschichtung aus. Die Membranen wurden in mit vorgewärmtem und begastem (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ) Inkubationsmedium befüllte 6-Well-Platten gelegt. Der optimale Zugang zum Medium sorgt für den Erhalt der Gewebestrukturen und der neuronalen Aktivität. Die Kulturen wurden für 21 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert.

<b>Präparationsmedium</b>	50 ml 2x MEM (Gibco) 1 ml 200 mM L-Glutamin (Gibco) Aq. dest. ad 50 ml, ph = 7,35
<b>Inkubationsmedium</b>	25 ml 2x MEM (Gibco) 1 ml 200 mM L-Glutamin (Gibco) 580 $\mu\text{l}$ 7,5 % Natriumbicarbonat 25 ml HBSS 25 ml Pferdeserum (Gibco) 1 ml 100x Penicillin/Streptomycin (Gibco) 1560 $\mu\text{l}$ 40 % Glucoselösung (Braun) Aq. dest. ad 100 ml, ph = 7,2

### 4.2.1.3 Immortalisierte Zelllinie HEK-293

HEK-293 Zellen wurden in Petrischalen ( $\varnothing$  10 cm) mit 10 ml Kulturmedium bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Je nach Zelldichte, wurden die Zellen alle 2–3 Tage passagiert. Das Medium wurde durch Waschen mit PBS entfernt und die Petrischalen mit 1 ml Trypsinlösung für 2–3 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Inaktivierung des

Enzyms wurden 9 ml serumhaltiges Kulturmedium zugegeben und die Zellsuspension mit einer Einmalpipette homogenisiert. Je nach benötigter Zelldichte und Menge wurde die Suspension 1:10 oder 1:50 in neue Petrischalen ausplattiert.

<b>Kulturmedium</b>	44,5 ml DMEM (Gibco) 5 ml fetales Kälberserum (Gibco) 500 µl 100x Penicillin/Streptomycin (Gibco)
<b>Trypsinlösung</b>	5 ml 2,5 % Trypsin (Gibco) PBS ad 50 ml

#### 4.2.1.4 Mediumwechsel und Phenylalaninstimulation

Der Mediumwechsel erfolgte für die hippocampalen Dispersionskulturen alle 3–4 Tage, für die organotypischen Gewebekulturen alle 2 Tage. Das vorhandene Medium wurde durch frisch angesetztes, vorgewärmtes Kulturmedium bzw. Inkubationsmedium ersetzt.

Für die Behandlung der Kulturen mit Phe in den Konzentrationen 1 mM, 2 mM und 5 mM wurde eine Phe-Stammlösung hergestellt. Die Molarität der Stammlösung 1 beträgt 0,125 mol/l. Für die Behandlung der Kulturen mit erhöhten Konzentrationen Phe, wurde für jede Behandlungsgruppe eine zweite Stammlösung aus der Stammlösung 1 hergestellt. Als Kontrolle diente das jeweilige Kultur- bzw. Inkubationsmedium. Das im Kulturmedium enthaltene Phe wurde bei der Berechnung der festgelegten Endkonzentrationen berücksichtigt.

<b>Stammlösung 1</b>	20,625mg Phenylalanin in 1 ml Neurobasal A
<b>Stammlösung 1 mM</b>	4,8 µl Stammlösung 1 pro ml Medium
<b>Stammlösung 2 mM</b>	12,8 µl Stammlösung 1 pro ml Medium
<b>Stammlösung 5 mM</b>	37 µl Stammlösung 1 pro ml Medium

#### 4.2.1.5 Kurzzeitstimulation mit NMDA

Der Einfluss von Phe auf die Signaltransduktion in Abhängigkeit exogener NMDA-Rezeptoraktivierung, wurde durch Stimulation der hippocampalen Dispersionskulturen

## Material und Methoden

mit 50  $\mu\text{M}$  NMDA untersucht. Dafür wurde eine NMDA-Stammlösung der Konzentration 0,01 M hergestellt. 5  $\mu\text{l}$  der Stammlösung wurden pro ml Medium auf die Zellen gegeben und diese für 10 min im Brutschrank inkubiert.

NMDA-Stammlösung		10 mg NMDA in 6,8 ml Aq. dest.
------------------	--	--------------------------------

### 4.2.1.6 Transfektion mit Effectene® Transfektionsreagenz

Die Transfektion der primären Neuronenkulturen wurde mit dem Effectene® Transfektionsreagenz (Qiagen) durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine nicht-liposomale Lipidformulierung. Aufgrund seiner geringen Zytotoxizität eignet es sich für anfällige Zellkultursysteme wie Primärkulturen. Der Enhancer kondensiert dabei die entsprechende DNA, während der spezielle Puffer für optimale Salzkonzentrationen sorgt. Das Effectene Reagent „umhüllt“ anschließend die kondensierte DNA mit kationisch geladenen Fetten, die Mizellen können dadurch optimal in eukaryotische Zellen aufgenommen werden. Transfektions-Vorversuche haben eine optimale Transfektionsrate nach 3 bzw. 11 Tagen in Kultur für eine Gesamtkulturzeit von 10 bzw. 14 Tagen ergeben. Pro 4 Wells wurden gemäß den Herstellervorgaben 1,5  $\mu\text{g}$  DNA in 150  $\mu\text{l}$  Puffer gelöst. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Enhancer wurde der Versuchsansatz für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Lösung wurde nach Zugabe von 14  $\mu\text{l}$  Effectene Reagent für 10 sek gevortext um eine homogene Verteilung zu erreichen und für weitere 10 min inkubiert. Zur Ausbildung der Micellen wurde 400  $\mu\text{l}$  frisch angesetztes, vorgewärmtes Kulturmedium dazugegeben und der Mix nach Mischen tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und abschließend in frischem Kulturmedium weiterkultiviert.

### 4.2.1.7 Transiente Transfektion durch Kalzium-Phosphat-Präzipitation

HEK-293 Zellen wurden mit der Kalzium-Phosphat Methode transfiziert. Eine optimale Transfektionsrate wurde bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 70 % erreicht. Für eine Zellkulturschale ( $\varnothing$  10 cm) wurde ein Versuchsansatz mit 13,5  $\mu\text{g}$  DNA, 165  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (2 M) und Wasser *ad* 1350  $\mu\text{l}$  vorbereitet. Zu jedem Ansatz wurden tropfenweise 1350  $\mu\text{l}$  2x HBS zugegeben. Um eine optimale Ausbeute an DNA-Kalziumphosphat-

Copräzipitaten zu erhalten, wurde Luft durch eine Pasteurpipette in den Versuchsansatz pipettiert. Der Mix wurde anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben und bei 37 °C und 3 % CO<sub>2</sub> übernacht (ÜN) inkubiert. Nachdem überschüssiges, nicht aufgenommenes Präzipitat mit vorgewärmtem PBS entfernt wurde, wurden die Zellen für weitere 24 h im Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

<b>2x HBS</b>	1,192 g HEPES (50 mM) 0,075 g KCl (10 mM) 0,216 g Dextrose (12 mM) 1,636 g NaCl (280 mM) 0,018 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,5 mM) Aq. dest. ad 100ml, ph = 7,0
<b>2 M CaCl<sub>2</sub></b>	2,2196 g CaCl <sub>2</sub> in 10 ml Aq. dest.

#### 4.2.1.8 Fixierung der Kulturen

Die auf Glasplättchen in den 24-Well-Platten kultivierten Neurone wurden für 20 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Das PFA wurde mit kaltem PBS (4 °C) entfernt und die Zellen bis zur weiteren Behandlung bei 4 °C in PBS gelagert.

Organotypische Gewebekulturen wurden mit vorgewärmtem PBS gewaschen und für 60 min mit 4 % PFA fixiert. Zur Entwässerung wurde das Gewebe anschließend in 25 % Saccharoselösung bei 4 °C inkubiert. Nach 4 h wurden die Gewebe in frische Saccharoselösung überführt. Am nächsten Tag wurde das Gewebe mit TissueTek O.C.T. Compound (Sakura) mittels Trockeneis auf Glasplättchen fixiert und am Kryostat in 12 µm dünne Scheiben geschnitten. Die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

<b>4 % Paraformaldehyd</b>	20 g Paraformaldehyd in 500 ml PBS bei 60 °C lösen ph = 7,4
<b>25%ige Saccharoselösung</b>	25 g Saccharose in 100 ml Aq. dest.

#### 4.2.1.9 Herstellung von Zelllysaten für Proteinanalysen

Zur Herstellung der Zelllysate wurden die Zellen entweder mit Ripa-Puffer oder dem Lysepuffer auf Eis von den 6-Well-Platten abgelöst. Durch die Anteile an Natriumdodecylsulfat (SDS) und/oder Natriumdeoxycholat besitzen die Puffer eine stark denaturierende und Zellmembran auflösende Wirkung. Um genomische DNA zu zerschneiden wurden die Lysate 3–4-mal durch 27½ G Kanülen gezogen. Die im Lysepuffer aufgenommenen Zellen wurden für 30 min in einem Überkopffrotor inkubiert und anschließend wie die Ripa-lysierten Zellen zur Trennung der löslichen Proteine von den verbliebenen Zellbestandteilen bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proteinproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

<b>Ripa-Puffer</b>	1,5 ml 5 M NaCl (150 mM) 2,5 ml 1 M Tris, ph = 7,5 (50 mM) 5 ml 10 % NP40 (1 %) 0,1 ml 10 % SDS (0,1 %) 2,5 ml 10 % Natriumdeoxycholat (0,5 %) 0,5 ml 0,5 M EDTA (5 mM) Aq. dest. ad 50 ml
<b>vor Verwendung</b>	Proteaseinhibitor 1:25 (Roche) Phosphataseinhibitor 1:10 (PhosStop, Roche)
<b>Lysepuffer (frisch angesetzt)</b>	2,5 ml 1 M Tris/HCl, ph = 7,4 0,5 ml 2 M MgCl <sub>2</sub> 1 ml 5 M NaCl 5 ml 10 % TX-100 2,5 ml 10% Natriumdeoxycholat 1 ml 10 % SDS 5 ml Glycerin Aq. dest. ad 50 ml Proteaseinhibitor 1:25 (Roche)

#### 4.2.2 *Pah<sup>enu2</sup>* Maus

Die von Shedlovsky et al. publizierte *Pah<sup>enu2</sup>* Maus (Shedlovsky et al., 1993) dient als Modellsystem der humanen Erkrankung PKU. Die DNA der Maus enthält eine Punktmutation im Exon 7 an Position 835. Die Base Thymin ist an dieser Stelle durch eine Cytosin-Base ersetzt. Der Austausch führt zu einer „missense“ Mutation, anstelle der Aminosäure Serin wird die Aminosäure Phe in das Protein eingebaut. Da der Austausch innerhalb des *PAH* kodierenden Bereichs liegt, kommt es zum vollständigen Funktionsverlust des Enzyms (McDonald and Charlton, 1997). Die Mutation wird autosomal-rezessiv vererbt.

##### 4.2.2.1 Genotypisierung der *Pah<sup>enu2</sup>* Maus

Mit dem Extract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma) wurde die DNA aus Gewebeprobe der neugeborenen Tiere extrahiert. Mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Primern, welche die Punktmutation in Exon 7 umschliessen, wurde die extrahierte DNA amplifiziert (McDonald and Charlton, 1997). Das 215 bp lange PCR Produkt wurde im Anschluss durch die Zugabe des Restriktionsenzym Alw26I, welches 5'...GTCTC...3' Sequenzen erkennt in maximal 4 Teile geschnitten (Abbildung 4-1). Elektrophoretische Auftrennung führt bei homozygoten Tieren zu 3 Banden (131, 50 und 34 bp lang), bei heterozygoten zu vier Banden (165, 131, 50 und 34 bp lang) und bei Wildtypen ebenfalls zu drei Banden (165, 50, 43 bp lang).

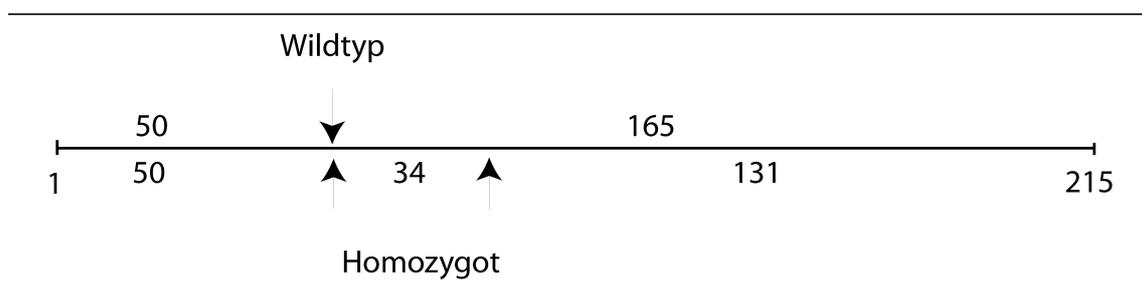


Abbildung 4-1: Schnittstellen des Restriktionsenzym

### 4.2.3 Elektronenmikroskopie

Für die Bestimmung der Synapsendichte wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt um die Ultrastruktur der zu untersuchenden Gewebe sichtbar zu machen.

#### 4.2.3.1 Fixierung des Gewebes für die Elektronenmikroskopie

Die organotypischen hippocampalen Gewebekulturen wurden einmal mit vorgewärmtem PBS, gefolgt von kaltem (4 °C) PBS, gewaschen. Zur Fixierung wurde das Gewebe für 24–48 h in 2,5 % Glutaraldehyd gelagert. Vor der weiteren Behandlung wurde das Gewebe zur Entfernung des Glutaraldehyd mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Zur Fixierung der Zellmembranen wurden die Gewebe für 30 min in 1 % Osmiumtetroxidlösung inkubiert. Osmiumtetroxid reagiert bevorzugt mit Lipiden und stabilisiert somit Zellmembranen, welche dadurch zusätzlich zugänglicher für das Kontrastmittel werden. Das Gewebe wird anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe langsam dehydriert, um Gewebeschäden durch Wassereinlagerungen zu vermeiden.

<b>0,2 M Phosphatpuffer</b>	5,52 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 42,88 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ Aq. dest. ad 1 l
<b>0,1 M Phosphatpuffer</b>	1 Teil 0,2 M Phosphatpuffer 1 Teil Aq. dest.
<b>2,5 % Glutaraldehydlösung</b>	100 ml 25 % Glutaraldehyd ad 1 l mit 0,1 M Phosphatpuffer
<b>Saccharosepufferlösung</b>	6,846 g Saccharose 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer
<b>2 % <math>\text{OsO}_4</math>-Lösung</b>	2 g $\text{OsO}_4$ in 100 ml Aq. dest.
<b>1 % <math>\text{OsO}_4</math>-Lösung</b>	1 Teil 2 % $\text{OsO}_4$ -Lösung 1 Teil Saccharosepufferlösung

#### 4.2.3.2 Eponeinbettung

Um das Gewebe für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in ultradünne Scheiben schneiden zu können, wurde es in Epon (Glycidether) eingebettet. Da Epon nicht mit

Ethanol mischbar ist, wurde das Gewebe nach der Alkoholreihe in Propylenoxid gegeben. Das Propylenoxid wird anschließend schrittweise durch Epon ersetzt. Dafür wurde das Gewebe zuerst in eine 1:1 Mischung aus Epon:Propylenoxid gegeben und für 3–4 h bei RT inkubiert wobei sich das Propylenoxid langsam verflüchtigt. Die Gewebekulturen wurden anschließend in einem Tropfen Epon auf eine Silikonplatte überführt und mit einer aufgelegten Folie bei 65 °C ÜN ausgehärtet. Durch die Folie entsteht eine plane Unterseite, auf welche eine mit Epon gefüllte Kapselhälfte über das Gewebestück gestellt wurde. Nach Aushärten des Epons ÜN konnten die Gewebelöcke am Microtom mit einem Diamantmesser in 1 µm dünne Scheiben geschnitten werden. Die Schnitte wurden mit Toluidinblau/Pyronin angefärbt. Die Farbstoffe interkalieren in die DNA und RNA und dienen der Darstellung der Zellbänder der CA1 und CA3 Region des Hippocampus. Mit einem Ultramicrotom konnten im Anschluss Ultradünnschnitte von 0,1 µm für die CA1 oder CA3 Region erstellt werden. Diese Ultradünnschnitte wurden auf einem Kupfergrid liegend zur Kontrastierung zuerst für 30 min mit Uranylacetat inkubiert, gefolgt von Inkubation mit Bleicitrat.

<b>Epon</b>	4 Teile Lösung A 6 Teile Lösung B 2 % Accelerator (Glycidether-Beschleuniger DMP-30)
<b>Lösung A</b>	62 ml Glycidether 100 ml DDSA
<b>Lösung B</b>	100 ml Glycidethe 89 ml MNA
<b>Bleicitratlösung</b>	1,33 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 1,76 g Natriumcitrat 7 ml NaOH Aq. dest. ad 50 ml
<b>Uranylacetat</b>	1 g Uranylacetat in 100 ml Aq. dest., filtrieren
<b>Toluidinblau/Pyronin</b>	1 Teil Toluidinblau 1 Teil Pyronin

### 4.2.3.3 Aufnahmen mit TEM und Bildanalyse

Von den kontrastierten Ultradünnschnitten wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop (CM 100, Philipps) Aufnahmen mit einer Vergrößerung von 2950x aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit einer CCD-Kamera (Quemesa, Olympus) detektiert und in digitaler Form abgespeichert. Für die anschließende stereologische Zählung der Spinesynapsen nach der ‚disector‘ Technik (Sterio, 1984) wurden Aufnahmen von konsekutiven Schnitten gemacht. Es wurde bei der Bildaufnahme darauf geachtet, dass Bereiche mit großen Dendriten oder Blutgefäßen nicht aufgezeichnet wurden. Asymmetrische Spinesynapsen wurden stereologisch ausgezählt. Symmetrische Synapsen und Synapsen am Dendritenhals wurden von der Zählung ausgeschlossen. Folgende Kriterien für eine asymmetrische Spinesynapse wurden festgelegt:

1. gut sichtbare präsynaptische Membran
2. präsynaptische Vesikel
3. vollständiger synaptischer Spalt
4. postsynaptische Membran mit elektronenreicher, postsynaptischer Dichte

Zuerst wurden alle Spinesynapsen auf den konsekutiven Schnittaufnahmen markiert. In die Auswertung flossen die markierten Spinesynapsen, die jeweils nur in einem Bild zu finden waren. Anschließend wurde ein Referenzquadrat (8 µm x 8 µm) auf einer definierten Position auf das Bild gelegt. Alle in diesem Referenzquadrat befindlichen Spinesynapsen wurden in die Auswertung einbezogen.

### 4.2.4 Immunhistochemische Methoden

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz lassen sich Proteine in fixierten Zellen oder Geweben sichtbar machen. Der Vorteil der in dieser Arbeit angewendeten „Sandwich-Methode“ ist die Möglichkeit der Komarkierung. Voraussetzung dafür ist, neben der Verwendung unterschiedlicher Fluorochrome, die Verwendung von Primärantikörpern unterschiedlicher Spezies und hoher Spezifität. Die Fluorochrome können durch Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen visuell sichtbar gemacht werden und mit Hilfe spezieller Kameras detektiert werden.

#### 4.2.4.1 Immuncytochemie

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen auf den Glasplättchen für 1 h mit 5 % BSA blockiert. Um die Proteine für die Antikörper zugänglich zu machen wurden die Neurone mit 0,2 % TX-100 für 10 min permeabilisiert. Die auf Objektträger aufgezogenen Gewebeschnitte wurden zuerst mit PBS rehydriert, mit 5 % NGS (normal goat serum) blockiert und anschließend mit 0,05 % TX-100 für 30 min permeabilisiert. Die Primärantikörper wurden ÜN bei 4 °C in der entsprechenden 2 % Blockierlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % TX-100 wurden die Glasplättchen bzw. die Gewebeschnitte für 2 h mit den entsprechenden Sekundärantikörpern in PBS inkubiert. Überschüssige Sekundärantikörper wurden durch Waschen mit PBS entfernt, gefolgt von der Kernfärbung der Neurone mit DAPI (1:1.000.000) für 5 min. Die Färbelösung wurde durch erneutes Waschen mit PBS entfernt. Zum Entfernen der Mineralsalze des Puffers wurden die Präparate vor dem Eindecken mit „Fluorescence Mounting Medium“ (Dako) mit Aq. dest. gewaschen.

<b>0,2 % TX-100</b>	2 ml TX-100 in 1 l PBS
<b>0,05 % TX-100</b>	500 µl TX-100 in 1 l PBS
<b>5 % BSA</b>	5 g Bovines Serum-Albumin in 100 ml 0,1 % TX-100
<b>2 % NGS</b>	2 µl NGS auf 100 µl 0,05% TX-100

#### 4.2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie und Intensitätsanalyse

Für die Aufnahme der Immunfluoreszenz wurden die Fluoreszenzmikroskope BZ-9000 (Keyence, BZ-9000 Software) und Axioskop 2 (Zeiss, AxioVision 3.1 Software) genutzt.

Übersichtsaufnahmen der Neurone für die Sholl-Analyse der Dendritenmorphologie und für die Bestimmung der proximalen Dendriten, sowie Übersichtsaufnahmen der Neurone für die TUNEL-Analyse wurden mit einem Plan NEOFLUAR 10x/0,45 oder einem Plan NEOFLUAR 20x/0,75 Objektiv (Zeiss) angefertigt. Die Analyse der Proteinexpressionen in den Ausläufern der Neurone, sowie die Bestimmung der

Spinanzahl und Morphologie erfolgte an Aufnahmen mit einem Plan APO  $\lambda$  60x/1,4 Öl-Immersionsobjektiv (Nikon).

Die Bestimmung der Expression aller in dieser Arbeit untersuchten Proteine erfolgte an quadratischen Ausschnitten einer festgelegten Größe (200 x 200 Pixel), welche um die Ausläufer der Neurone gelegt wurden. Da im Rahmen dieser Arbeit die Expression in den Ausläufern und Spines untersucht werden sollte, wurden Zellkern und Soma bei der Auswahl der Ausschnitte ausgeschlossen. Die Signalintensität wurde anschließend mit dem Softwareprogramm ImageJ (NCBI) bestimmt (Abramoff et al., 2004).

### 4.2.4.3 Apoptosenachweis mittels TUNEL-Assay

Während der Apoptose kommt es im Zellkern zur Fragmentierung des DNA-Stranges mit Entstehung von Doppelstrang- und Einzelstrangbrüchen. An den Bruchstellen wird eine Hydroxygruppe (3'-OH-Gruppe) frei, welche für die Detektion apoptotischer Vorgänge genutzt werden kann. Das Enzym terminale-Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) baut im Falle von freien Hydroxygruppen an diese Fluoreszenz-markierte Nukleotide, welche anschließend fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden können. In dieser Arbeit wurde für den Apoptosenachweis mittels TUNEL-Assay das ‚In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein‘, (Roche) benutzt. Das Vorgehen entsprach dabei den Angaben des Herstellers. Der TUNEL Reaktionsmix wurde durch Mischen von 50  $\mu$ l Enzyme Solution mit 450  $\mu$ l Labeling Solution vorbereitet. Die auf Glasplättchen fixierten Neurone wurden dreimal mit PBS gewaschen. 50  $\mu$ l des vorbereiteten TUNEL Reaktionsmix wurden auf jedes Glasplättchen gegeben. Für eine homogene Verteilung des Mixes wurden sie mit Parafilm abgedeckt und in einer feuchten Kammer für 60 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Überschüssiger Reaktionsmix wurde durch Waschen mit PBS entfernt. Zur Quantifizierung der Zelldichte wurden die Zellkerne mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, gefolgt von einem Waschschrift mit Aq. dest. zur Entfernung der Mineralsalze, wurden die Glasplättchen mit ‚Fluorescent Mounting Medium‘ (Dako) auf Objektträger gebettet. TUNEL-positive Zellen sowie die DAPI-positiven Kerne wurden an fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ausgezählt. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurde das Verhältnis TUNEL-positiver Kerne zu DAPI-positiven Kernen gebildet.

#### **4.2.4.4 Sholl-Analyse**

Das Ziel der Sholl-Analyse liegt in der quantitativen Bestimmung der morphologischen Gegebenheiten (Sholl, 1953). In der vorliegenden Arbeit wurde die Sholl-Analyse zur Bestimmung der Dendritenmorphologie angewendet. Durch die Färbung des Zellkerns mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI wurde für jede Zelle der Mittelpunkt festgelegt, um den anschließend, automatisiert, konzentrische Kreise definierten Abstands gelegt wurden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ein Startradius von 50  $\mu\text{m}$ , ein Endradius von 230  $\mu\text{m}$ , sowie eine Spanne von 20  $\mu\text{m}$  zwischen zwei aufeinanderfolgenden Kreisen festgelegt. Das Softwareprogramm ImageJ errechnet anschließend für jeden der festgelegten Kreise die Berührungspunkte mit den Zellausläufern.

#### **4.2.4.5 Proximaler Dendritenabschnitt**

Die Bestimmung des proximalen Dendritenabschnitts erfolgte manuell. Es wurden die Dendriten der 1.–4. Ordnung gezählt. Alle Ausläufer aus dem Soma wurden als Dendriten 1. Ordnung (Primärdendriten) klassifiziert. Kommt es zur Teilung dieser Primärdendriten, wurde die Schnittstelle markiert und die davon ausgehenden Ausläufer als Dendriten 2. Ordnung klassifiziert. Kam es zur Teilung dieser Sekundärdendriten, wurde die Teilungsstelle andersfarbig markiert und die davon ausgehenden Dendriten als Dendriten 3. Ordnung klassifiziert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, um die Dendriten 4. Ordnung klassifizieren zu können. Anschließend wurden für das gesamte Neuron die Dendriten jeder Ordnung quantifiziert.

#### **4.2.4.6 Evaluierung der Spinedichte und -morphologie**

Zur Quantifizierung der Spinedichte eines Neurons wurden an Dendriten der 3.–6. Ordnung die Spines gezählt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Spinedichte zwischen den Behandlungsgruppen wurde die Anzahl der Spines auf eine Dendritenlänge von 100  $\mu\text{m}$  normiert.

Für die Evaluierung der Spines nach morphologischen Kriterien wurde für jeden Spine, falls vorhanden, der Spine-Kopf Durchmesser und die Spine-Hals Länge gemessen. Die sogenannten ‚branched‘ Spines wurden nicht vermessen, sondern lediglich gezählt.

### 4.2.5 Molekularbiologische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit kamen verschiedene molekularbiologische Methoden zur Klärung der Fragesetzungen zum Einsatz. Die Prinzipien sowie das genaue Vorgehen werden in den folgenden Kapiteln erläutert.

#### 4.2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Länge der aufzutrennenden Nukleinsäuren wurden Agarosegele unterschiedlicher Konzentration (0,5–2 %) hergestellt. Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten DNA oder RNA wurde Ethidiumbromid (Genaxxon Bioscience) in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen was zu einem veränderten Absorptionsspektrum und in der Folge zu einer gesteigerten Fluoreszenz nach Anregung mit ultraviolettem Licht führt. Die Nukleinsäuren sowie der DNA-Leiter wurden mit 6x DNA-Ladepuffer (Thermo Scientific) versetzt und bei einer Spannung von 100 V in TBE-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Banden wurden zur Analyse mit einem BIO-Print M1 Geldokumentationssystem und der darin integrierten CCD-Analysekamera dokumentiert.

<b>DEPC-Wasser</b>	1 ml DEPC (Sigma) in 1 l Aq. dest. ÜN; autoklavieren
<b>0,5x TBE-Puffer</b>	50 ml 10x TBE Aq. dest. ad 1 l (DEPC-Wasser für RNA)
<b>TBE-Laufpuffer</b>	50 ml 0,5x TBE Aq. dest. ad 1 l (DEPC-Wasser für RNA)
<b>Gele</b>	0,5 – 2 g Agarose in 100 ml TBE-Laufpuffer lösen Ethidiumbromid 0,1 µg/µl zugeben, polymerisieren lassen

#### 4.2.5.2 Extraktion und Reinigung von mRNA

Die Extraktion von mRNA aus Hippocampusgewebe von 12 Wochen alten *Pah<sup>enu2</sup>* Mäusen und ihrer Wildtyp Geschwistertiere erfolgte mit dem RNeasy Kit (Qiagen). Das Kit arbeitet nach der Methode von Chomczynski and Sacchi (1987), bei der die RNA

durch einen Guanidinthiocyanat-haltigen Puffer extrahiert wird. Guanidinthiocyanat denaturiert durch seine chaotropen Eigenschaften Proteine und Enzyme, wie z.B. störende RNasen. Zur Homogenisierung des Gewebes wurde der QIAshredder (Qiagen) genutzt. Die Aufreinigung der RNA basiert auf dem Prinzip der spezifischen Bindung von RNA an Silika-beschichtete Membranen und der anschließenden Elution der RNA mit RNase freiem Wasser.

Zur Beseitigung möglicher DNA Verunreinigung in der eluierten mRNA, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dafür wurden 90 µl RNA mit 10 µl 10x TurboDNase-Puffer (Invitrogen) und 1,5 µl TurboDNase I (Invitrogen) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die RNA-Integrität wurde mit der Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Intakte RNA besteht aus einer 28S-rRNA, einer 18S-rRNA und einer 5S-rRNA, welche bei angelegter elektrischer Spannung gut sichtbar aufgetrennt werden. Bei einem 2:1 Verhältnis der 28S- und 18S-Bande kann von einer intakten RNA ausgegangen werden.

#### **4.2.5.3 cDNA Synthese mittels Reverser Transkriptase**

mRNA wurde mit dem RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen) zu cDNA synthetisiert. Die Vorgehensweise war entsprechend den Angaben des Herstellers. In einem ersten Schritt wurde genomische DNA eliminiert. Das Enzym Reverse Transkriptase synthetisiert aus einer einzelsträngigen RNA zuerst einen RNA-DNA-Hybridstrang, welcher im nächsten Schritt durch die RNase-H Aktivität zu doppelsträngiger cDNA vervollständigt wird. Als Qualitätskontrolle wurde mit der gewonnenen cDNA eine PCR der house-keeping Gene 18S und HPRT durchgeführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20 °C eingefroren.

#### **4.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur Amplifizierung eines bestimmten DNA-Abschnitts genutzt. Dies dient dem Nachweis bestimmter DNA Sequenzen. Die PCR besteht grundlegend aus drei Schritten. Zuerst erfolgte der Denaturierungsschritt bei 94°C, bei dem sich die beiden Stränge der Ausgangs-DNA (*template*) voneinander trennen. Im anschließenden Annealingschritt wird die Temperatur abhängig von den verwendeten Primern auf 50–65 °C gesenkt. Dabei kommt zur Hybridisierung der zugegebenen Oligonukleotide (Primer) an die zuvor getrennte Ausgangs-DNA. Im

letzten Schritt, dem Elongationsschritt, erhöht man die Temperatur auf 72 °C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, die den hybridisierten Primer verlängert, bis ein der ursprünglichen Ausgangs-DNA exakt gleichender Doppelstrang vorliegt. Mit dem Durchlauf eines solchen Zyklus lässt sich die *template*-DNA verdoppeln. Um ausreichende Mengen DNA zu erhalten, kann der Zyklus bis zu 30-mal wiederholt werden. Dieses Verfahren wurde zur Bestimmung des Genotyps verwendet.

	Menge pro Ansatz
H <sub>2</sub> O	17,8 µl
10x Puffer (Invitrogen)	2,5 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen)	1,0 µl
dNTP (Invitrogen)	0,5 µl
Primer forward	0,5 µl
Primer reverse	0,5 µl
Taq (Invitrogen)	0,2 µl
	23 µl + 2 µl DNA

Tabelle 4-11: Zusammensetzung Standard PCR

95 °C	5 min
94 °C	20 sek
59 °C	45 sek
72 °C	90 sek
72 °C	10 min
4 °C	hold

Tabelle 4-12: Temperaturprogramm Standard PCR

#### 4.2.5.5 *Real-time quantitative PCR*

Diese spezielle Variante der PCR erlaubt die semiquantitative Bestimmung der Genexpression eines ausgewählten Gens. In der vorliegenden Arbeit wurde die sehr sensitive TaqMan® Real-Time PCR durchgeführt. Die Methode macht sich die 5′-3′-

Exonuklease Aktivität der Taq-Polymerase zunutze (Holland et al., 1991). Zusätzlich zu den entsprechenden Primern gibt es spezielle TaqMan ‚probes‘. Diese ‚probes‘ binden in der cDNA Region, die durch die gewählten Primer amplifiziert werden soll. Die TaqMan ‚probes‘ bestehen aus einem kovalent an das 5'-Ende gebundenen Fluorophor (6-FAM) und einem an das 3'-Ende gebundenen Quencher (englisch: Fluoreszenzlöscher). Solange das Fluorochrom und der Quencher in enger räumlicher Verbindung zueinander stehen, unterdrückt der Quencher das Signal des nach jedem Zyklus durchgeführten Förster-Resonanzenergietransfer (FRET (Förster, 1948)). Erreicht die Taq-Polymerase durch die Synthese des komplementären DNA-Stranges die an den DNA-Strang angelagerte TaqMan ‚probes‘, degradiert sie diese und das Fluorophor wird freigesetzt. Durch die entstandene, fehlende räumliche Nähe des Fluorophors zum Quencher, kann das Fluoreszenzsignal detektiert werden. Das detektierte Signal ist direkt proportional zur entstandenen *template*-DNA. Jede untersuchte cDNA Probe wurde als Dreifachansatz eingesetzt. Als interner Standard diente HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1). Zur internen Kontrolle wurden für jeden Primer Wasserproben und *no-template* Proben mitgeführt.

	Menge pro Ansatz
<b>20x Assay Mix</b>	1 $\mu$ l
<b>2x Master Mix</b>	10 $\mu$ l
<b>RNase-freies Wasser</b>	7 $\mu$ l
	<b>18 <math>\mu</math>l + 2 <math>\mu</math>l cDNA</b>

**Tabelle 4-13: TaqMan *real-time* qPCR Ansatz**

Die relative Expression der Zielgene wurde anschließend wie in Abbildung 4-2 dargestellt nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet (Livak and Schmittgen, 2001).

I.	$\Delta CT = CT_{GOI} - CT_{HKG}$
II.	$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{KO} - \Delta CT_{WT}$
III.	Menge = $2^{-\Delta\Delta CT}$
GOI = gene of interest, HKG = house-keeping gene, KO = knockout, hier <i>Pah<sup>emu2</sup></i> Maus, WT = Wildtyp	

Abbildung 4-2: Berechnung der Expression nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode

#### 4.2.5.6 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Unter Transformation versteht man die Einbringung von DNA in kompetente Bakterienzellen und dient der Vermehrung des in die Bakterien eingebrachten DNA Abschnittes. In dieser Arbeit wurde ausschließlich nicht-virale DNA in Form von Plasmiden in Bakterien transformiert. Die Aufnahme der Plasmide geschieht durch die natürliche oder chemisch erzeugte Kompetenz von Bakterien des *Escherichia coli* (*E. coli*.) Stammes, DNA aufzunehmen und zu insertieren. Pro Versuchsansatz wurden 50  $\mu$ l chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 0,2–0,6 ng des entsprechenden Plasmids versetzt. Nach einer Reaktionsphase von 30 min auf Eis wurde für 30 sek ein Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt um die Aufnahmeeffizienz zu erhöhen. Nach Zugabe von 950  $\mu$ l LB-Medium wurde die Bakteriensuspension für 30 min bei 37 °C geschüttelt. Jeweils 100  $\mu$ l und 200  $\mu$ l der Bakteriensuspension wurden anschließend mit einem ausgeglühten Drigalski-Spatel auf LB<sub>AB</sub>-Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden ÜN bei 37 °C bebrütet.

<b>LB-Medium</b>	5 g Hefeextrakt 10 g Tryptone 5 g NaCl Aq. dest ad 1 l, ph = 7,0 Selektionsantibiotikum
<b>Agarplatten</b>	LB-Medium 15 g Agarose Selektionsantibiotikum

#### 4.2.5.7 Midipräparation von Plasmid DNA

Die Plasmidisolierung wurde mit dem HiSpeed® Plasmid Purification Kit (Qiagen) durchgeführt, welches sich das Prinzip der alkalischen Lyse zunutze macht. Dafür wurde eine nach erfolgreicher Transformation gebildete Kolonie gepickt und in 3 ml LB-Medium und unter Zugabe des entsprechenden Selektionsantibiotikums aufgenommen. Diese Vorkultur wurde für 6 h bei 225 rpm und 37 °C geschüttelt und anschließend in 150 ml vorgewärmtes LB-Medium - mit entsprechendem Antibiotikum - überführt und ebenfalls bei 37 °C und 225 rpm als ÜN-Kultur geschüttelt. Die Kulturen haben nach dieser Zeit eine Dichte von 3–4 x 10<sup>9</sup> Zellen pro ml und befinden sich am Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase. Die Zellen wurden für 15 min bei 6000 g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet für die alkalische Lyse in Puffer resuspendiert. Alle weiteren Schritte erfolgten genau nach Anweisung des Herstellers. Die DNA wurde abschließend mit TE-Puffer eluiert.

<b>Kanamycin Stammlösung</b>	50 mg Kanamycin in 1 ml Aq. dest.
<b>Ampicillin Stammlösung</b>	50 mg Ampicillin in 1 ml Aq. dest.

#### 4.2.5.8 Glycerolkulturen

Zur längerfristigen Lagerung des aufgenommenen Plasmids wurden Glycerolkulturen angelegt. Dafür wurde zu 600 µl der ÜN-Kultur 400 µl steriles Glycerol gegeben, gut gemischt, und für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Lagerung wurden die Glycerolkulturen bei -80 °C eingefroren.

#### 4.2.5.9 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Zur Überprüfung der durchgeführten Transformation oder der durchgeführten PCR wurden die zu untersuchenden DNA Abschnitte mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Abhängig von Vektor, Insert oder amplifizierte DNA wurden entsprechende Restriktionsenzyme ausgewählt. Pro 1 µg DNA wurden jeweils 1 µl der entsprechenden Enzyme, sowie 2 µl des FastDigest® Puffers (Thermo Scientific) zugesetzt. Nach 15 min bei 37 °C wurden die Proben mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese

elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt und mit dem Geldokumentationssystem dokumentiert.

### 4.2.5.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektroskopisch über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Absorption von 1,0 entspricht dabei einer Lösung von 50 µg doppelsträngiger DNA oder 40 µg einer einzelsträngigen DNA bzw. RNA. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt, gibt das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  den Reinheitsgrad der Probe an und sollte zwischen 1,8–2,0 liegen. Kleinere Werte sind durch zu hohe Proteinverunreinigungen zu erklären. Weitere Einflussgrößen sind Trübungseffekte, gerätespezifische Einflüsse oder Absorption von Pufferlösungen und werden bei einer OD von 320 nm gemessen. Die gemessenen Absorptionen bei  $OD_{320}$  werden von der eigentlichen Absorption bei  $OD_{260}$  subtrahiert. Über das Lambert-Beersche Gesetz lässt sich die Konzentration der Nukleinsäuren bestimmen:

$$c_{\text{DNA}} (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times V_d$$

$$c_{\text{RNA}} (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \times V_d$$

---

$V_d$  = Verdünnungsfaktor der Probe

### 4.2.5.11 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden bei der Firma Seqlab in Auftrag gegeben. Die zu sequenzierenden DNA-Proben wurden auf eine Konzentration von 80 ng/µl mit Aq. dest. verdünnt. Das finale Probenvolumen, inklusive Primer, ergab 15 µl. Für die Sequenzierung des pcDNA3.1 Vektors wurde die reverse Primerlösung in den DNA-Ansatz zugegeben. Die weitere Bearbeitung wurde von der Firma Seqlab durchgeführt.

### 4.2.5.12 Proteinexpression in *Escherichia coli*

Für die Proteinexpression in *E.coli* wurde eine nach erfolgreicher Transformation gebildete Kolonie (siehe 4.2.5.6 Transformation chemisch kompetenter Bakterien) gepickt und in 5 ml LB-Medium unter Zugabe des entsprechenden Selektionsantibiotikums aufgenommen. Die Vorkultur wurde für 6 h bei 37 °C und 225

rpm geschüttelt und als ÜN-Kultur in 50 ml LB-Medium mit Antibiotikazusätzen bei 37 °C und 225 rpm weitergeschüttelt. Diese ÜN-Kultur wurde als Großkultur in zwei 2-Liter-Kolben mit jeweils 500 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD von 0,6–0,8 bei 37 °C weitergeschüttelt. Als Kontrolle wurden jeweils 50 ml dieser Großkultur abgenommen und separat weitergeschüttelt. Bei erreichter OD von 0,6–0,8 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 ml 100 mM IPTG (Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid) gestartet. IPTG bindet an den Lac-Repressor des Plasmids und bewirkt dadurch eine Konformationsänderung. Diese Konformationsänderung führt zu einer Aktivierung des Promotors, welcher dadurch die Transkription und Translation des rekombinanten Proteins startet (Baneyx, 1999). Die zuvor separierten 50 ml werden als Kontrolle nicht mit IPTG induziert. Nach 2–3 h wird erneut die OD bestimmt und jeweils 1 ml als Kontrolle der Induktion abgenommen. Die nicht-induzierte Suspension wurde nach Abnahme von jeweils 1 ml verworfen. Die Großkultur wurde bei 4 °C und 6.000 rpm in 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit kaltem (4 °C) PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in 20 ml kaltem PBS aufgenommen, homogenisiert und in 600  $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Anwendung wurden die Aliquots bei -80 °C gelagert. Zur Überprüfung der erfolgten Induktion wurde mit den abgenommenen Kontrollen eine SDS-PAGE und anschließende Comassi-Färbung durchgeführt.

**IPTG (100 mM)**

238 mg in 100 ml Aq. dest.

#### **4.2.6 Biochemische Methoden**

Die zur Klärung der Fragestellung notwendigen biochemischen Methoden und ihre genaue Anwendung sind im Folgende erläutert.

##### **4.2.6.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde photometrisch nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) durchgeführt, bei der man sich die Eigenschaften des in saurer Lösung anionischen Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau zunutze macht. Der Farbstoff bildet Komplexe mit den kationischen und unpolaren Seitenketten der

Proteine und verschiebt dadurch das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm. Mit Hilfe einer Standardkurve kann die Proteinkonzentration bestimmt werden. Für die Standardkurve wurde Rinderalbumin in Konzentrationen von 1,25–10 µg/µl eingesetzt.

### 4.2.6.2 SDS-Page

Unter SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) versteht man die Auftrennung eines Proteingemischs im elektrischen Feld, abhängig von ihrer Molekülmasse. Die Gelelektrophorese wurde nach der diskontinuierlichen Methode von U.K. Lämmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Um die Proteine für eine zuverlässige Auftrennung zu linearisieren, wurden sie durch Zugabe von anionischem SDS (5x Lämmli-Probenpuffer) und 5 min Kochen bei 95 °C denaturiert. Da die zu untersuchenden Proteine Molekulargewichte um 15 kDa aufweisen, wurden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 15 % hergestellt. Durch den hohen Anteil an Acrylamid kommt es zu einer engmaschigen Polymerisierung. Die Sammelgele wurden großporiger hergestellt, um eine optimale Aufkonzentrierung der Proteine an der Trenngel-Sammelgel Grenze zu erreichen. Als Größenmarker wurde der PageRuler™ Plus Prestained (ThermoScientific) verwendet. Die Proteine wurden bei einer konstanten Spannung von 150 V in Lämmli-Laufpuffer aufgetrennt. Die Gele wurden entweder für einen Immunblot (Western Blot) verwendet, oder mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt.

<b>5x Lämmli-Probenpuffer</b>	7,81 ml Tris/HCl, pH = 6,8 2,5 g SDS 12,5 ml Glycerol 2,5 ml Mercaptoethanol Aq. dest. ad 25 ml
<b>Lämmli-Laufpuffer</b>	3 g Tris 14,4 g Glycin 1 g SDS Aq. dest. ad 1 l
<b>10 % SDS</b>	50 g SDS in 500 ml Aq. dest.
<b>Sol 2</b>	36,3 g Tris 8 ml 10 % SDS Aq. dest. ad 200 ml

<b>Sol 3</b>	6 g Tris 4 ml 10% SDS Aq. dest. ad 200 ml
<b>10 % APS</b>	10 g APS in 100 g Aq. dest.

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
<b>30 % Acrylamid</b>	4,98 ml	1 ml
<b>Sol 2</b>	2,5 ml	-
<b>Sol 3</b>	-	2,5 ml
<b>Aq. dest.</b>	2,52 ml	6,5 ml
<b>10 % APS</b>	100 µl	100 µl
<b>TEMED</b>	20 µl	20 µl

Tabelle 4-14: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel

#### 4.2.6.3 Coomassie-Färbung

Die Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau ÜN zeigt die Proteinverteilung in den Gelen an und ist ein guter Indikator für eine gleichmäßige und erfolgreiche Auftrennung des Proteingemisches. Das Gel wird ÜN in Coomassie-Farblösung inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung gewaschen. Zur Dokumentation wurden die Gele gescannt.

<b>Coomassie-Farblösung</b>	20 ml Methanol 60 ml Aq. dest. 20 ml 5x Roti-Blue
<b>Entfärbelösung</b>	25 ml Methanol 75 ml Aq. dest.

#### 4.2.6.4 Immunblot (Western Blot)

Um die aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines Immunblots quantifizieren zu können, wurden sie auf eine Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,22 µm, Sartorius) geblottet.

## Material und Methoden

Die Membran wurde zuvor im Methanol-haltigem Transferpuffer equilibriert. Durch eine konstant angelegte Spannung von 40 V und unter Kühlung wurden die Proteine aus dem Acrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran geblottet. Die Membranen wurden anschließend für 10 min in Ponceau S inkubiert. Ponceau S ist ein roter, wasserlöslicher Azofarbstoff, der reversibel an positiv geladene Aminogruppen von Proteinen bindet. Die Färbung dient der Qualitätsprüfung des erfolgten Blottens. Die gefärbten Membranen wurden zur Dokumentation eingescannt.

<b>12,5x Transferpuffer</b>	18,2 g Tris 90 g Glycin Aq. dest. ad 1 l, ph = 8,3
<b>Transferpuffer</b>	80 ml 12,5x Transfer Puffer 200 ml Methanol 2 ml 10 % SDS Aq. dest. ad 1 l

Die Membranen wurden anschließend zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen für 1 h mit 5 % Magermilchlösung inkubiert. Die Verdünnung des Primärantikörpers erfolgte ebenfalls in 5 % Magermilchlösung. Die Membranen wurden rotierend ÜN bei 4 °C mit der Primärantikörperlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T zum Entfernen der überschüssigen Antikörper wurden die Membranen für 2 h mit der Sekundärantikörperlösung inkubiert. Überschüssiger Sekundärantikörper wurden ebenfalls durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sowie die eingesetzten Verdünnungen sind in Tabelle 4-2 und Tabelle 4-3 aufgelistet.

<b>TBS</b>	8 g NaCl 0,2 g KCl 3 g Tris Aq. dest. ad 1 l, ph = 7,4
<b>TBS-T</b>	1 ml Tween-20 auf 1 l TBS
<b>5 % Magermilchlösung</b>	5 g Bio-Magermilchpulver (Heirler) auf 100 ml TBS-T

#### 4.2.6.5 Immundetektion mittels Meerrettichperoxidase

Die Detektion der auf Nitrocellulosemembranen geblotteten Proteine erfolgte mittels Chemilumineszenz. In dieser Arbeit wurde das ECL Substrate (Pierret) für die Detektion verwendet. Das zugegebene Substrat Wasserstoffperoxid wird durch die katalytische Aktivität der Meerrettichperoxidase, welche an die eingesetzten sekundären Antikörper konjugiert ist, reduziert, was wiederum zur Oxidation des zugegebenen Farbstoffs 3-Amino-Phthalsäurehydrazid (Luminol) unter Lichtemission führt. Durch Zugabe eines Enhancers wird die Intensität des emittierten Lichts um das 10-fache gesteigert. Mit Hilfe einer CCD-Kamera wurde das Lichtsignal entsprechend seiner Intensität in ein digitales Bild umgewandelt und aufgezeichnet. Die Membranen wurden hierfür mit einer 1:1 Mischung Substrat und Enhancer für 2 min inkubiert und entsprechend der Signalstärke belichtet. Die aufgenommenen Bilder wurden mit der ImageJ Software (NIH) nach Luke Miller (<http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>) ausgewertet.

#### 4.2.6.6 GST-Pulldown

Der Pulldown-Assay dient dazu, *in-vitro* Bindungen zwischen Proteinen nachzuweisen. Die Methode basiert auf der Affinität eines *bait*-Proteins (Köder) sein *prey*-Protein (Beute) zu binden. Die Glutathion-S-Transferase (Kriegstein and Gotz) besitzt sehr hohe Affinität zu Glutathion und wurde in der vorliegenden Arbeit als Protein-tag eingesetzt (Sambrook and Russell, 2006). Mit Hilfe des GST-Pulldowns wurde in der vorliegenden Arbeit spezifisch die aktivierte, GTP-gebundene Form der GTPase Rac1 bestimmt. Zum Nachweis des aktivierten Rac1 wurde ein Fusionsprotein welches die Bindungsdomäne für GTP-gebundenes Rac1 (p21 activated kinase (Pak)) sowie GST enthält, in *E.coli* exprimiert (siehe: 4.2.5.12 Proteinexpression in *Escherichia coli*). Für den Pulldown wurde pro Versuchsansatz ein Aliquot (600 µl) des entsprechenden Fusionsproteins in *E.coli* durch Beschallung mit Ultraschall (Sonifier B-12, 3 x 15 Stöße) aufgeschlossen. Nach Zugabe von 60 µl 10 % TX-100 wurden die unlöslichen Bestandteile mittels Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, 4 °C) sedimentiert woraufhin die löslichen Proteine mit dem Überstand entnommen werden konnten. Die gewonnenen Fusionsproteine wurden durch Inkubation in einem Überkopf-Rotor bei 4 °C für 1 h an 20 µl Glutathionsepharose 4B (GE Healthcare) gekoppelt. Glutathionsepharose 4B

## Material und Methoden

enthält den natürlichen Liganden für GST, das Glutathion. Der als *bait*-Molekül fungierende Ansatz wurde 3-mal mit Lysepuffer gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Das zu untersuchende Zellysate wurde als *prey*-Ansatz für 30 min bei 4 °C in einem Überkopf-Rotor mit dem *bait*-Ansatz inkubiert. Zur Entfernung unspezifischer Proteine wurde das Gemisch 3-mal mit Waschpuffer gewaschen. Der Versuchsansatz wurde in 2x Lämmli-Ladepuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

### Waschpuffer

0,5 ml 1 M Tris, ph = 7,4
0,5 ml 2 M MgCl <sub>2</sub>
1 ml 5 M NaCl
0,5 ml Glycerin
0,5 ml Nonidet P40
Aq. dest. ad 50 ml
Proteaseinhibitor 1:25 (Roche)

### 4.2.7 Statistik

Für die statistische Auswertung der Experimente wurde zunächst der Mittelwert der Daten für jedes Experiment gebildet und die Standardfehler berechnet (SEM).

Die Daten aus den *in-vivo* Experimenten wurden mit Hilfe des ‚Student’s *t*-Test‘ für unverbundene Stichproben statistisch ausgewertet. Die Daten aus den *in-vitro* Experimenten wurden mit einer Varianzanalyse (ANOVA) und anschließenden Post-hoc Tests (LSD) ausgewertet. Mit einer ANOVA kann nur festgestellt werden, ob es in einer Gruppe von Mittelwerten signifikante Unterschiede gibt. Für die paarweisen Vergleiche der Mittelwerte wurde ein Post-hoc Test angeschlossen. Bei gleicher Homogenität der Varianzen (Levene’s test  $p > 0,05$ ) wurde das Signifikanzniveau auf  $p \leq 0,05$  festgesetzt. Dies entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\leq 5 \%$ . Bei Ungleichheit der Varianzen (Levene’s Test:  $p \leq 0,05$ ) wurde das Signifikanzniveau auf  $p \leq 0,01$  festgesetzt, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % entspricht.

## Literaturverzeichnis

- Abramoff MD, Paulo JM, Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ. vol. 11, pp 36-42: Biophotonics International.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM (Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10:1538-1543.2007).
- Alder J, Kanki H, Valtorta F, Greengard P, Poo MM (Overexpression of synaptophysin enhances neurotransmitter secretion at *Xenopus* neuromuscular synapses. *J Neurosci* 15:511-519.1995).
- Allen PB, Ouimet CC, Greengard P (Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9956-9961.1997).
- Andolina D, Conversi D, Cabib S, Trabalza A, Ventura R, Puglisi-Allegra S, Pascucci T (5-Hydroxytryptophan during critical postnatal period improves cognitive performances and promotes dendritic spine maturation in genetic mouse model of phenylketonuria. *Int J Neuropsychopharmacol* 14:479-489.2011).
- Armstrong D, Dunn JK, Antalffy B, Trivedi R (Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:195-201.1995).
- Armstrong DD, Dunn K, Antalffy B (Decreased dendritic branching in frontal, motor and limbic cortex in Rett syndrome compared with trisomy 21. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:1013-1017.1998).
- Bahrini I, Song JH, Diez D, Hanayama R (Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. *Sci Rep* 5:7989.2015).
- Bamburg JR (Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:185-230.1999).
- Baneyx F (Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10:411-421.1999).
- Bauman ML, Kemper TL (Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta Neuropathol* 58:55-63.1982).
- Becher A, Drenkhahn A, Pahner I, Margittai M, Jahn R, Ahnert-Hilger G (The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J Neurosci* 19:1922-1931.1999).
- Becker LE, Armstrong DL, Chan F (Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Ann Neurol* 20:520-526.1986).
- Bennett MK (SNAREs and the specificity of transport vesicle targeting. *Curr Opin Cell Biol* 7:581-586.1995).
- Benveniste EN, Nguyen VT, O'Keefe GM (Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 39:381-391.2001).
- Bickel H, Bachmann C, Beckers R, Brandt NJ, Clayton BE, Corrado G, Feingold HJ, Giardini O, Hammersen G, Schonberg D (Neonatal Mass-Screening for Metabolic Disorders - Summary of Recent Sessions of the Committee of Experts to Study Inborn Metabolic Diseases, Public-

## Literaturverzeichnis

- Health Committee, Council-of-Europe - Review. *European Journal of Pediatrics* 137:133-139.1981).
- Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM (Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 265:812-813.1953).
- Blau N, Thöny B, Cotton RGH, Hyland K (2001) Disorders of Tetrahydrobiopterin and Related Biogenic Amines: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler K, Vogelstein B, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1725-76.
- Bonanomi D, Rusconi L, Colombo CA, Benfenati F, Valtorta F (Synaptophysin I selectively specifies the exocytic pathway of synaptobrevin 2/VAMP2. *Biochem J* 404:525-534.2007).
- Bonhoeffer T, Yuste R (Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron* 35:1019-1027.2002).
- Bradford MM (A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.1976).
- Brewer GJ (Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J Neurosci Methods* 71:143-155.1997).
- Buchsbaum RJ, Connolly BA, Feig LA (Regulation of p70 S6 kinase by complex formation between the Rac guanine nucleotide exchange factor (Rac-GEF) Tiam1 and the scaffold spinophilin. *J Biol Chem* 278:18833-18841.2003).
- Burgard P, Bremer HJ, Buhrdel P, Clemens PC, Monch E, Przyrembel H, Trefz FK, Ullrich K (Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria 1997. *Eur J Pediatr* 158:46-54.1999).
- Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH, Pantaloni D (Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* 136:1307-1322.1997).
- Chen YA, Scales SJ, Patel SM, Doung YC, Scheller RH (SNARE complex formation is triggered by Ca<sup>2+</sup> and drives membrane fusion. *Cell* 97:165-174.1999).
- Chomczynski P, Sacchi N (Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.1987).
- Cordero ME, Trejo M, Colombo M, Aranda V (Histological maturation of the neocortex in phenylketonuric rats. *Early Hum Dev* 8:157-173.1983).
- Curtius HC, Baerlocher K, Vollmin JA (Pathogenesis of phenylketonuria: inhibition of DOPA and catecholamine synthesis in patients with phenylketonuria. *Clin Chim Acta* 42:235-239.1972a).
- Curtius HC, Vollmin JA, Baerloch K (Use of Deuterated Phenylalanine for Elucidation of Phenylalanine-Tyrosine Metabolism. *Clinica Chimica Acta* 37:277-&.1972b).
- Dailey ME, Smith SJ (The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16:2983-2994.1996).
- de Freitas MS, de Mattos-Dutra A, Schroder N, Wannmacher CM, Pessoa-Pureur R (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* 143:188-195.1997).

- de Lima AD, Merten MD, Voigt T (Neuritic differentiation and synaptogenesis in serum-free neuronal cultures of the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 382:230-246.1997).
- Deller T, Korte M, Chabanis S, Drakew A, Schwegler H, Stefani GG, Zuniga A, Schwarz K, Bonhoeffer T, Zeller R, Frotscher M, Mundel P (Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10494-10499.2003).
- Deng PY, Rotman Z, Blundon JA, Cho Y, Cui J, Cavalli V, Zakharenko SS, Klyachko VA (FMRP regulates neurotransmitter release and synaptic information transmission by modulating action potential duration via BK channels. *Neuron* 77:696-711.2013).
- Deng W, Aimone JB, Gage FH (New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339-350.2010).
- DesMarais V, Macaluso F, Condeelis J, Bailly M (Synergistic interaction between the Arp2/3 complex and cofilin drives stimulated lamellipod extension. *J Cell Sci* 117:3499-3510.2004).
- Dobrunz LE, Stevens CF (Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18:995-1008.1997).
- Dobson JC, Kushida E, Williamson M, Friedman EG (Intellectual performance of 36 phenylketonuria patients and their nonaffected siblings. *Pediatrics* 58:53-58.1976).
- Drogari E, Smith I, Beasley M, Lloyd JK (Timing of strict diet in relation to fetal damage in maternal phenylketonuria. An international collaborative study by the MRC/DHSS Phenylketonuria Register. *Lancet* 2:927-930.1987).
- Dyer CA, Kendler A, Philibotte T, Gardiner P, Cruz J, Levy HL (Evidence for central nervous system glial cell plasticity in phenylketonuria. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:795-814.1996).
- Feng J, Yan Z, Ferreira A, Tomizawa K, Liauw JA, Zhuo M, Allen PB, Ouimet CC, Greengard P (Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9287-9292.2000).
- Fleming IN, Elliott CM, Buchanan FG, Downes CP, Exton JH (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates Tiam1 by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem* 274:12753-12758.1999).
- Folling A (ed.) (1934) Über Ausscheidung von Phenylabrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität: *Biological Chemistry*, 227: Issue 1-4, 1934.
- Folling I (The discovery of phenylketonuria. *Acta Paediatr Suppl* 407:4-10.1994).
- Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. vol. 437, pp 55-75: *Annalen der Physik*.
- Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B (Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 81:1285-1297.2002).
- Glushakov AV, Dennis DM, Morey TE, Sumners C, Cucchiara RF, Seubert CN, Martynyuk AE (Specific inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor function in rat hippocampal neurons by L-phenylalanine at concentrations observed during phenylketonuria. *Mol Psychiatry* 7:359-367.2002).

## Literaturverzeichnis

- Glushakov AV, Dennis DM, Sumners C, Seubert CN, Martynyuk AE (L-phenylalanine selectively depresses currents at glutamatergic excitatory synapses. *J Neurosci Res* 72:116-124.2003).
- Glushakov AV, Glushakova O, Varshney M, Bajpai LK, Sumners C, Laipis PJ, Embury JE, Baker SP, Otero DH, Dennis DM, Seubert CN, Martynyuk AE (Long-term changes in glutamatergic synaptic transmission in phenylketonuria. *Brain* 128:300-307.2005).
- Gomez-Nicola D, Perry VH (Microglial Dynamics and Role in the Healthy and Diseased Brain: A Paradigm of Functional Plasticity. *Neuroscientist*.2014).
- Gordon SL, Leube RE, Cousin MA (Synaptophysin is required for synaptobrevin retrieval during synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci* 31:14032-14036.2011).
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74.1977).
- Guldberg P, Henriksen KF, Sipila I, Guttler F, de la Chapelle A (Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterisation of mutations in Finland. *J Med Genet* 32:976-978.1995).
- Guthrie R, Susi A (A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. *Pediatrics* 32:338-343.1963).
- Hailer NP, Jarhult JD, Nitsch R (Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 18:319-331.1996).
- Harris KM, Fiala JC, Ostroff L (Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:745-748.2003).
- Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L (Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10896-10901.1998).
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7276-7280.1991).
- Horling K, Schlegel G, Schulz S, Vierk R, Ullrich K, Santer R, Rune GM (Hippocampal synaptic connectivity in phenylketonuria. *Hum Mol Genet*.2014).
- Horster F, Schwab MA, Sauer SW, Pietz J, Hoffmann GF, Okun JG, Kolker S, Kins S (Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice. *Pediatr Res* 59:544-548.2006).
- Huttenlocher PR (Dendritic development and mental defect. *Neurology* 20:381.1970).
- Huttenlocher PR (Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia* 28:517-527.1990).
- Ikeda M, Levitt M, Udenfriend S (Phenylalanine as substrate and inhibitor of tyrosine hydroxylase. *Arch Biochem Biophys* 120:420-427.1967).
- Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiya H, Schall TJ, Yoshie O (Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91:521-530.1997).

- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S (Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 57:1-9.1998).
- Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y (Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke* 32:1208-1215.2001).
- Jacobs T, Causeret F, Nishimura YV, Terao M, Norman A, Hoshino M, Nikolic M (Localized activation of p21-activated kinase controls neuronal polarity and morphology. *J Neurosci* 27:8604-8615.2007).
- Jaffe AB, Hall A (Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:247-269.2005).
- Jensen E (2005) Chapter 1. Meet Your Amazing Brain. Teaching with the brain in mind 2nd edition.
- Jervis GA (Studies on phenylpyruvic oligophrenia; the position of the metabolic error. *J Biol Chem* 169:651-656.1947).
- Jervis GA (Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proc Soc Exp Biol Med* 82:514-515.1953).
- Kaufman S (A model of human phenylalanine metabolism in normal subjects and in phenylketonuric patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3160-3164.1999).
- Kaufmann WE, Moser HW (Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex* 10:981-991.2000).
- Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P, Scriver CR (Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 61:1309-1317.1997).
- Kelly PT, Vernon P (Changes in the subcellular distribution of calmodulin-kinase II during brain development. *Brain Res* 350:211-224.1985).
- Kim KW, Vallon-Eberhard A, Zigmond E, Farache J, Shezen E, Shakhar G, Ludwig A, Lira SA, Jung S (In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood* 118:e156-167.2011).
- Kleindienst T, Winnubst J, Roth-Alpermann C, Bonhoeffer T, Lohmann C (Activity-dependent clustering of functional synaptic inputs on developing hippocampal dendrites. *Neuron* 72:1012-1024.2011).
- Knerr I, Zschocke J, Schellmoser S, Topf HG, Weigel C, Dotsch J, Rascher W (An exceptional Albanian family with seven children presenting with dysmorphic features and mental retardation: maternal phenylketonuria. *BMC Pediatr* 5:5.2005).
- Knudsen GM, Hasselbalch S, Toft PB, Christensen E, Paulson OB, Lou H (Blood-brain barrier transport of amino acids in healthy controls and in patients with phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 18:653-664.1995).
- Kozma R, Sarner S, Ahmed S, Lim L (Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol* 17:1201-1211.1997).
- Kriegstein AR, Gotz M (Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 43:37-43.2003).

## Literaturverzeichnis

- Lacey DJ (Hippocampal dendritic abnormalities in a rat model of phenylketonuria. *Ann Neurol* 16:577-580.1984).
- Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming FJ, Belly A, Bodon G, Blot B, Haase G, Goldberg Y, Sadoul R (Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci* 46:409-418.2011).
- Laemmli UK (Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.1970).
- Lenke RR, Levy HL (Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. An international survey of the outcome of untreated and treated pregnancies. *N Engl J Med* 303:1202-1208.1980).
- Levy HL, Ghavami M (Maternal phenylketonuria: a metabolic teratogen. *Teratology* 53:176-184.1996).
- Li D, Gu X, Lu L, Liang L (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* 339:1-7.2010).
- Liang L, Gu X, Lu L, Li D, Zhang X (Phenylketonuria-related synaptic changes in a BTBR-Pah(enu2) mouse model. *Neuroreport* 22:617-622.2011).
- Lichtman JW, Colman H (Synapse elimination and indelible memory. *Neuron* 25:269-278.2000).
- Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao FT, Rabin M, Ruddle FH, Woo SL (Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6221-6225.1985).
- Lisman J, Schulman H, Cline H (The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3:175-190.2002).
- Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S (Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* 13:169-182.2012).
- Livak KJ, Schmittgen TD (Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.2001).
- Low LK, Cheng HJ (Axon pruning: an essential step underlying the developmental plasticity of neuronal connections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1531-1544.2006).
- Luo L, O'Leary DD (Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 28:127-156.2005).
- Maclean PD (The limbic system ("visceral brain") and emotional behavior. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 73:130-134.1955).
- Mallat M, Marin-Teva JL, Cheret C (Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Curr Opin Neurobiol* 15:101-107.2005).
- Marin-Padilla M (Structural abnormalities of the cerebral cortex in human chromosomal aberrations: a Golgi study. *Brain Res* 44:625-629.1972).
- McDonald JD, Bode VC, Dove WF, Shedlovsky A (Pahhph-5: a mouse mutant deficient in phenylalanine hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1965-1967.1990).

- McDonald JD, Charlton CK (Characterization of mutations at the mouse phenylalanine hydroxylase locus. *Genomics* 39:402-405.1997).
- Meberg PJ, Ono S, Minamide LS, Takahashi M, Bamberg JR (Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil Cytoskeleton* 39:172-190.1998).
- Meng Y, Zhang Y, Tregoubov V, Janus C, Cruz L, Jackson M, Lu WY, MacDonald JF, Wang JY, Falls DL, Jia Z (Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* 35:121-133.2002).
- Milner B (1966) Amnesia following operation in the temporal lobes: Whitty, C. W. M. and Zangwill O. L., Amnesia, p. 109-133, Butterworths, London, 1966.
- Miyamoto A, Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J (Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. *Front Cell Neurosci* 7:70.2013).
- Morita H, Suzuki K, Mori N, Yasuhara O (Occurrence of complement protein C3 in dying pyramidal neurons in rat hippocampus after systemic administration of kainic acid. *Neurosci Lett* 409:35-40.2006).
- Mütze U, Arélin M, Beblo S (Klassische Phenylketonurie und Tetrahydrobiopterin (BH4)-responsive Hyperphenylalaninämie. Eine Übersicht. *Kinder- und Jugendmedizin* 11:243-250.2011).
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64:313-353.2002).
- Ozalp I, Coskun T, Tokatli A, Kalkanoglu HS, Dursun A, Tokol S, Koksall G, Ozguc M, Kose R (Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future. *Turk J Pediatr* 43:97-101.2001).
- Paine RS (The variability in manifestations of untreated patients with phenylketonuria (phenylpyruvic aciduria). *Pediatrics* 20:290-302.1957).
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT (Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456-1458.2011).
- Papez JW (A proposed mechanism of emotion. 1937. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 7:103-112.1995).
- Pascucci T, Ventura R, Puglisi-Allegra S, Cabib S (Deficits in brain serotonin synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport* 13:2561-2564.2002).
- Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F, Valtorta F (Synaptophysin I controls the targeting of VAMP2/synaptobrevin II to synaptic vesicles. *Mol Biol Cell* 14:4909-4919.2003).
- Penrose L, Quastel JH (Metabolic studies in phenylketonuria. *Biochem J* 31:266-274.1937).
- Pietz J, Kreis R, Rupp A, Mayatepek E, Rating D, Boesch C, Bremer HJ (Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest* 103:1169-1178.1999).
- Prinz M, Prinz B, Schulz E (The growth of non-pyramidal neurons in the primary motor cortex of man: a Golgi study. *Histol Histopathol* 12:895-900.1997).

## Literaturverzeichnis

- Puglisi-Allegra S, Cabib S, Pascucci T, Ventura R, Cali F, Romano V (Dramatic brain aminergic deficit in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport* 11:1361-1364.2000).
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, White LE (2012) *Neuroscience*: Sinauer Associates, Inc., 5th edition.
- Reuter H, Seitz N (The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol* 195:451-470.1968).
- Reynolds R, Burri R, Mahal S, Herschkowitz N (Disturbed myelinogenesis and recovery in hyperphenylalaninemia in rats: an immunohistochemical study. *Exp Neurol* 115:347-367.1992).
- Riva E, Fiocchi A, Agostoni C, Biasucci G, Sala M, Banderali G, Luotti D, Giovannini M (PKU-related dysgammaglobulinaemia: the effect of diet therapy on IgE and allergic sensitization. *J Inherit Metab Dis* 17:710-717.1994).
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK (Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17:942-964, table of contents.2004).
- Rossman KL, Der CJ, Sondek J (GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:167-180.2005).
- Rouse B, Matalon R, Koch R, Azen C, Levy H, Hanley W, Trefz F, de la Cruz F (Maternal phenylketonuria syndrome: congenital heart defects, microcephaly, and developmental outcomes. *J Pediatr* 136:57-61.2000).
- Sambrook J, Russell DW (Detection of Protein-Protein Interactions Using the GST Fusion Protein Pulldown Technique. *CSH Protoc* 2006.2006).
- Sarrouilhe D, di Tommaso A, Metaye T, Ladeveze V (Spinophilin: from partners to functions. *Biochimie* 88:1099-1113.2006).
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74:691-705.2012).
- Schulz E, Scholz B ([Neurohistological findings in the parietal cortex of children with chromosome aberrations]. *J Hirnforsch* 33:37-62.1992).
- Scriver CR, Waters PJ (Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 15:267-272.1999).
- Segal M, Vlachos A, Korkotian E (The spine apparatus, synaptopodin, and dendritic spine plasticity. *Neuroscientist* 16:125-131.2010).
- Shedlovsky A, McDonald JD, Symula D, Dove WF (Mouse models of human phenylketonuria. *Genetics* 134:1205-1210.1993).
- Shields SM, Ingebritsen TS, Kelly PT (Identification of protein phosphatase 1 in synaptic junctions: dephosphorylation of endogenous calmodulin-dependent kinase II and synapse-enriched phosphoproteins. *J Neurosci* 5:3414-3422.1985).
- Sholl DA (Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87:387-406.1953).

- Sorra KE, Fiala JC, Harris KM (Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine branching in hippocampal synapse formation. *J Comp Neurol* 398:225-240.1998).
- Squire LR (Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99:195-231.1992).
- Stephan AH, Barres BA, Stevens B (The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci* 35:369-389.2012).
- Sterio DC (The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134:127-136.1984).
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA (The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131:1164-1178.2007).
- Stevenson JE, Hawcroft J, Lobascher M, Smith I, Wolff OH, Graham PJ (Behavioural deviance in children with early treated phenylketonuria. *Arch Dis Child* 54:14-18.1979).
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.1991).
- Street CA, Bryan BA (Rho kinase proteins--pleiotropic modulators of cell survival and apoptosis. *Anticancer Res* 31:3645-3657.2011).
- Takashima S, Becker LE, Armstrong DL, Chan F (Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain Res* 225:1-21.1981).
- Thompson AJ, Tillotson S, Smith I, Kendall B, Moore SG, Brenton DP (Brain MRI changes in phenylketonuria. Associations with dietary status. *Brain* 116 ( Pt 4):811-821.1993).
- Threadgill R, Bobb K, Ghosh A (Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron* 19:625-634.1997).
- Trommald M, Hulleberg G (Dimensions and density of dendritic spines from rat dentate granule cells based on reconstructions from serial electron micrographs. *J Comp Neurol* 377:15-28.1997).
- Tzima E, Del Pozo MA, Kiosses WB, Mohamed SA, Li S, Chien S, Schwartz MA (Activation of Rac1 by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression. *EMBO J* 21:6791-6800.2002).
- Ulfig N, Nickel J, Bohl J (Monoclonal antibodies SMI 311 and SMI 312 as tools to investigate the maturation of nerve cells and axonal patterns in human fetal brain. *Cell Tissue Res* 291:433-443.1998).
- Vlachos A, Korkotian E, Schonfeld E, Copanaki E, Deller T, Segal M (Synaptopodin regulates plasticity of dendritic spines in hippocampal neurons. *J Neurosci* 29:1017-1033.2009).
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J (Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29:3974-3980.2009).
- Weglage J, Pietsch M, Funders B, Koch HG, Ullrich K (Neurological findings in early treated phenylketonuria. *Acta Paediatr* 84:411-415.1995).

## Literaturverzeichnis

- Weglage J, Pietsch M, Funders B, Koch HG, Ullrich K (Deficits in selective and sustained attention processes in early treated children with phenylketonuria--result of impaired frontal lobe functions? *Eur J Pediatr* 155:200-204.1996).
- Weng SM, McLeod F, Bailey ME, Cobb SR (Synaptic plasticity deficits in an experimental model of rett syndrome: long-term potentiation saturation and its pharmacological reversal. *Neuroscience* 180:314-321.2011).
- Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR (Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin Biochem Rev* 29:31-41.2008).
- Wong RO, Ghosh A (Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci* 3:803-812.2002).
- Wu GY, Cline HT (Stabilization of dendritic arbor structure in vivo by CaMKII. *Science* 279:222-226.1998).
- Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, Nishida E, Mizuno K (Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 393:809-812.1998).
- Yun SH, Trommer BL (Fragile X mice: reduced long-term potentiation and N-Methyl-D-Aspartate receptor-mediated neurotransmission in dentate gyrus. *J Neurosci Res* 89:176-182.2011).
- Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski AL, Bifone A, Gozzi A, Ragozzino D, Gross CT (Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci* 17:400-406.2014).
- Zhang Y, Zhang H, Yuan X, Gu X (Differential effects of phenylalanine on Rac1, Cdc42, and RhoA expression and activity in cultured cortical neurons. *Pediatr Res* 62:8-13.2007).
- Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 6:2950-2967.1986).
- Zschocke J, Hoffmann GF (Phenylketonuria mutations in Germany. *Hum Genet* 104:390-398.1999).
- Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan WB (Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* 46:181-189.2005).

## 5 Anhang

### 5.1 Eingesetzte Chemikalien

Substanz	H-Sätze	p-Sätze	Firma
<b>50x B27</b>	-	-	Gibco
<b>Acrylamid 30%</b>	340, 350, 361F, 372	302, 312, 315, 319, 317	Roth
<b>Agarose</b>	-	-	Sigma
<b>Ammoniumperoxodisulfat</b>	272, 302, 315, 317, 319, 334, 335	220, 261, 280, 305+351+338, 342+311	Sigma
<b>Ampicillin</b>	315, 319, 317, 334	305+351+338, 337+313, 332+313, 304+340, 342+311, 280	Sigma
<b>Aqua dest.</b>	-	-	Braun
<b>Bleinitrat</b>	272, 360DF, 332, 302, 318, 373, 400, 410	201, 273, 305+351+338, 308+313	AppliChem
<b>Dapi</b>	-	-	Sigma
<b>DDSA</b>	315, 319, 335	280, 261, 302+352, 305+351+338, 337+313	Roth
<b>DEPC</b>	302, 315, 319, 335	261, 305+351+338	Sigma
<b>Dinatriumhydrogenphosphat</b>	-	-	Sigma
<b>DMEM</b>	-	-	Gibco
<b>DMP-30</b>	302, 315, 319	280, 301+312, 302+352, 305+351+338, 332+313, 337+313	Roth
<b>EDTA</b>	319	305+351+338	Sigma
<b>Epon</b>	319, 335	280, 304+340,	Roth

Anhang

		305+351+338, 312, 337+313	
<b>Ethanol</b>	225	210	VWR
<b>Ethidiumbromid</b>	341, 330, 302	281, 302+352, 305+351+338, 304+340, 309, 310	Genaxxon
<b>Glucoselösung 40 %</b>	-	-	Braun
<b>Glutaraldehyd</b>	331, 301, 314, 334, 317, 400	280, 305+351+338, 270, 260, 273, 308+313	Sigma
<b>Glycerin</b>	-	-	AppliChem
<b>HBSS</b>	-	-	Gibco
<b>HEPES</b>	-	-	Gibco
<b>Hydrogencarbonat</b>	280	410+403	Sigma
<b>IPTG</b>	-	-	Roth
<b>Kälberserum, fetales</b>	-	-	Gibco
<b>Kaliumchlorid</b>	-	-	Sigma
<b>Kalziumchlorid</b>	319	305+351+338	Sigma
<b>Kanamycin</b>	360, 372	308+313, 314, 281, 260, 202, 201	Gibco
<b>L-Glutamin</b>	-	-	Gibco
<b>Magnesiumchlorid</b>	-	-	Sigma
<b>Magnesiumchlorid</b>	-	-	Invitrogen
<b>MEM</b>	-	-	Gibco
<b>Mercaptoethanol</b>	301, 310+330, 315, 318, 410	280, 273, 302+352, 304+340, 305+351+338, 310	Roth
<b>Methanol</b>	225, 331, 311, 301, 370	210, 233, 280, 302+352	VWR

<b>MNA</b>	302, 315, 319, 334, 335	280, 301+312, 302+352, 304+341, 305+351+338	Roth
<b>Natriumbicarbonat</b>	-	-	Sigma
<b>Natriumchlorid</b>	-	-	Sigma
<b>Natriumcitrat</b>	-	-	AppliChem
<b>Natriumdeoxycholat</b>	302, 315, 319, 335	261, 305+351+338	AppliChem
<b>Natriumdihydrogenphosphat</b>	-	-	Sigma
<b>Natriumhydroxid</b>	314, 290	280, 301+330+331, 309+310, 305+351+338	Sigma
<b>Natriumlaurylsulfat</b>	228, 311, 302, 335, 315, 319	210, 280, 304+340, 305+351+338, 309+310	Sigma
<b>Neurobasal A (ohne Phenolrot)</b>	-	-	Gibco
<b>NMDA</b>	-	-	Sigma
<b>Nonidet P-40</b>	302, 318, 411	280, 301+312, 305+351+338	AppliChem
<b>NP40</b>	302, 318, 411	273, 280, 305+351+338	Thermo
<b>Osmiumtetroxid</b>	330, 310, 300, 314	280, 301+331, 302+342, 304+340, 305+351+338, 309+310	Sigma
<b>Paraformaldehyd</b>	228, 302, 332, 351, 335, 315, 319, 317	281, 302+352, 305+351, 338, 308+313, 304+340	Sigma
<b>Penicillin/ Streptomycin</b>	317, 334, 360, 371	304+340, 342+311, 302+352, 308+313, 280	Gibco
<b>Pferdeserum, hitzeinaktiviert</b>	-	-	Gibco
<b>Phenylalanin</b>	-	-	Sigma
<b>Phosphatase- inhibitor</b>	301	264, 270, 301+310+330, 405, 501	Roche
<b>Propylenoxid</b>	224, 350, 340,	201, 210, 261,	Sigma

Anhang

	332, 312, 302, 319, 335, 315	305+351+338, 308+313	
<b>Proteaseinhibitor</b>	314	260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338	Roche
<b>Pyronin</b>	-	-	Sigma
<b>Rit-Blue</b>	-	-	Roth
<b>Saccharose</b>	-	-	Sigma
<b>Sauerstoff</b>	280, 270	244, 220, 370+376, 403	
<b>TBE</b>	315, 319, 335	280, 305+351+338, 302+352	Roth
<b>TEMED</b>	225, 332, 302, 314	210, 233, 280, 301+330+331, 305+351+338, 309+310	AppliChem
<b>Toluidinblau</b>	-	-	Sigma
<b>Tris</b>	315, 319, 335	261, 305+351+338	Sigma
<b>Triton-X 100</b>	302, 318, 411	273, 280, 305+351+338	AppliChem
<b>Trypsin</b>	316, 334	332+313, 302+341, 285, 261	Gibco
<b>Trypsin/EDTA</b>	334	304+340, 261, 432+311, 284	Gibco
<b>Tween-20</b>	-	-	Sigma
<b>Uranylacetat</b>	330, 300, 373, 411	260, 264, 273, 284, 301+310, 310	Sigma
<b>Ziegenserum</b>	-	-	Gibco

## 5.2 H- und P -Sätze des GHS

Hazard Statements / H-Sätze

<b>H200-Reihe</b>	<b>Physikalisch-chemische Gefahren</b>
<b>H224</b>	Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
<b>H225</b>	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
<b>H228</b>	Entzündbarer Feststoff.
<b>H272</b>	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
<b>H290</b>	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
<b>H300-Reihe</b>	<b>Gesundheitsgefahren</b>
<b>H300</b>	Lebensgefahr bei Verschlucken.
<b>H301</b>	Giftig bei Verschlucken.
<b>H302</b>	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
<b>H310</b>	Lebensgefahr bei Hautkontakt.
<b>H311</b>	Giftig bei Hautkontakt.
<b>H312</b>	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
<b>H314</b>	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
<b>H315</b>	Verursacht Hautreizungen
<b>H316</b>	Verursacht milde Hautreizungen
<b>H317</b>	Kann allergische Hautreaktionen verursachen
<b>H318</b>	Verursacht schwere Augenschäden.
<b>H319</b>	Verursacht schwere Augenreizung.
<b>H320</b>	Verursacht Augenreizung
<b>H330</b>	Lebensgefahr bei Einatmen.
<b>H331</b>	Giftig bei Einatmen.

## Anhang

<b>H332</b>	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
<b>H332</b>	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
<b>H334</b>	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen
<b>H335</b>	Kann die Atemwege reizen
<b>H340</b>	Kann genetische Defekte verursachen
<b>H341</b>	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen
<b>H350</b>	Kann Krebs verursachen
<b>H351</b>	Kann vermutlich Krebs verursachen
<b>H360</b>	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen (F) oder das Kind im Mutterleib schädigen (D)
<b>H370</b>	Schädigt die Organe.
<b>H371</b>	Kann die Organe schädigen
<b>H400-Reihe</b>	<b>Umweltgefahren</b>
<b>H400</b>	Sehr giftig für Wasserorganismen.
<b>H410</b>	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
<b>H411</b>	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
<b>H412</b>	Schädlich für Wasserorganismen, Langzeitwirkung.

### Ergänzende Gefahrenmerkmale der EU

	<b>Gesundheitsgefahren</b>
<b>EUH032</b>	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

## Precautionary Statements / P-Sätze

<b>P200-Reihe</b>	<b>Vorbeugung</b>
<b>P201</b>	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
<b>P210</b>	Von Hitze, heissen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen.
<b>P220</b>	Von Kleidung/.../brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
<b>P233</b>	Behälter dicht verschlossen halten.
<b>P260</b>	Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
<b>P261</b>	Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden.
<b>P264</b>	Nach Gebrauch Hände gründlich waschen
<b>P264</b>	Nach Gebrauch Haut gründlich waschen.
<b>P270</b>	Bei Verwendung dieses Produkts nicht essen, trinken oder rauchen.
<b>P270</b>	Bei Verwendung dieses Produkts nicht essen, trinken oder rauchen.
<b>P271</b>	Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
<b>P273</b>	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
<b>P280</b>	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
<b>P281</b>	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
<b>P285</b>	Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen
<b>P300-Reihe</b>	<b>Gegenmaßnahmen</b>
<b>P301 + P310</b>	Bei Verschlucken: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
<b>P301 + P312</b>	Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
<b>P301 + P330 + P331</b>	Bei Verschlucken: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.
<b>P302 + P352</b>	Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen
<b>P304 + P340</b>	Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert

## Anhang

<b>P304 + P341</b>	Bei Einatmen: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert
<b>P305 + P351 + P338</b>	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
<b>P305+P351+P338</b>	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
<b>P308 + P313</b>	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
<b>P308 + P311</b>	Bei Exposition oder falls betroffen: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
<b>P309 + P310</b>	Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen
<b>P310</b>	Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
<b>P312</b>	Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
<b>P313</b>	Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen
<b>P332 + P313</b>	Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen
<b>P337 + P313</b>	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen
<b>P340</b>	Die betroffene Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
<b>P342 + P311</b>	Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen
<b>P363</b>	Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen
<b>P400-Reihe</b>	<b>Lagerung</b>
<b>P405</b>	Unter Verschluss aufbewahren.
<b>P500-Reihe</b>	<b>Abfall</b>
<b>P501</b>	Inhalt/Behälter ... zuführen. (...gemäß lokalen/ regionalen/ nationalen/ internationalen Vorschriften anzugeben).

### 5.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Hydroxylierung von Phenylalanin .....	3
Abbildung 1-2: Aufbau Hippocampus .....	6
Abbildung 1-3: Zelltypen im Hippocampus, modifiziert nach Jensen (Jensen, 2005).....	8
Abbildung 1-4: Neuronale Verschaltung im Hippocampus, modifiziert nach Deng (2010)9	
Abbildung 1-5: Hippocampale Nervenzelle .....	11
Abbildung 1-6: CaMKII-Rac1-vermittelter Signalweg zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts .....	12
Abbildung 1-7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus der CA1 Region .....	14
Abbildung 1-8: Überblick der Spinekategorien.....	14
Abbildung 2-1: TUNEL-Assay zur Evaluierung apoptotischer Effekte .....	24
Abbildung 2-2: Sholl-Analyse der Dendritenverzweigungen .....	26
Abbildung 2-3: Quantifizierung der proximalen Dendriten .....	28
Abbildung 2-4: Axonwachstum nach Phenylalaninbehandlung .....	30
Abbildung 2-5: Spinesynapsen in hippocampalen Gewebekulturen .....	32
Abbildung 2-6: Quantifizierung der Spines.....	34
Abbildung 2-7: Snap-25 Expression in den Ausläufern hippocampaler Neurone .....	36
Abbildung 2-8: Synaptobrevinexpression in den Ausläufern hippocampaler Neurone .....	37
Abbildung 2-9: Synaptophysinexpression in den Ausläufern hippocampalermpaler Neurone .....	38
Abbildung 2-10: Spinophilinexpression in den Ausläufern hippocampaler Neurone.....	39
Abbildung 2-11: Synaptopodinexpression in den Ausläufern hippocampaler Neurone .....	40
Abbildung 2-12: Quantifizierung der Cofilinexpression.....	42
Abbildung 2-13: Quantifizierung p-Cofilinmenge .....	43
Abbildung 2-14: Verhältnis p-Cofilin zu Gesamtcofilin.....	44
Abbildung 2-15: Einfluss von Phenylalanin auf die GTPase Rac1 .....	46
Abbildung 2-16: Expression der CaMKII und p-CaMKII .....	48
Abbildung 2-17: Verhältnis p-CaMKII zu CaMKII.....	49
Abbildung 2-18: Mikrogliaaktivität in der <i>Pah<sup>emu2</sup></i> Maus (modifiziert nach Horling, 2014)51	
Abbildung 2-19: Quantifizierung der PCR nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode .....	52
Abbildung 2-20: Mikrogliaaktivität in hippocampalen Gewebekulturen.....	53
Abbildung 3-1: Präsynaptische Neurotransmitterfreisetzung.....	60
Abbildung 3-2: Spinophilin und sein Einfluss auf das Zytoskelett.....	62

## Anhang

Abbildung 4-1: Schnittstellen des Restriktionsenzym	85
Abbildung 4-2: Berechnung der Expression nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode	96

### 5.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Gruppierung der Spines nach morphologischen Kriterien	33
Tabelle 4-1: Zelllinien	71
Tabelle 4-2: Eingesetzte Primärantikörper und ihre Verdünnungen	72
Tabelle 4-3: Eingesetzte Sekundärantikörper und ihre Verdünnungen	73
Tabelle 4-4: Bakterienstämme	73
Tabelle 4-5: Oligonukleotide mit Sequenzen	74
Tabelle 4-6: Enzyme und ihre Verwendung	75
Tabelle 4-7: Größenstandards	75
Tabelle 4-8: Angewendete Kits	76
Tabelle 4-9: Benötigte Geräte	78
Tabelle 4-10: Eingesetzte Software	78
Tabelle 4-11: Zusammensetzung Standard PCR	94
Tabelle 4-12: Temperaturprogramm Standard PCR	94
Tabelle 4-13: TaqMan <i>real-time</i> qPCR Ansatz	95
Tabelle 4-14: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel	101

## 5.5 Publikationsverzeichnis

### Originalveröffentlichungen

K. Horling\*, **G. Schlegel\***, S. Schulz, R. Vierk, K. Ullrich, R. Santer, G. M. Rune (2014): Hippocampal synaptic connectivity in phenylketonuria. Human Molecular Genetics, vol. 24(4) pp. 1007 – 18

\*: geteilte Erstautorenschaft

**G. Schlegel**, R. Scholz, R. Santer, K. Ullrich, G. M. Rune (2015): Two-fold effects of dysfunctional phenylalanine hydroxylase on synaptogenesis in the hippocampus in Phenylketonuria. Submitted

### Vorträge

“A new hypothesis for pathophysiology of mental retardation of PKU patients”

47th European Metabolic Group Conference, Venice 2015

“Synaptische Konnektivität im Hippocampus bei Phenylketonurie”

29. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselerkrankungen,

Fulda 2015

„Einfluss von Phenylalanin auf die Synaptische Konnektivität im Hippocampus“

Fortbildungsveranstaltung für Medizinerinnen und Mediziner, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 2014

**Posterbeiträge**

**G. Schlegel**, K. Horling, R. Santer, K. Ullrich, G. M. Rune

Changes in the expression of genes associated with synaptic plasticity in the *Pah<sup>enu2</sup>* mouse.

Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, 2011

**G. Schlegel**, K. Horling, R. Santer, K. Ullrich, G. M. Rune

Hippocampal dendritic and spine development in response to phenylalanine.

58th Annual Meeting of the German Society for Neuropathology and Neuroanatomy (DGNN), Göttingen, 2013

**G. Schlegel**, K. Horling, S. Schulz, R. Vierk, R. Santer, K. Ullrich, G. M. Rune

Disturbed synaptic connectivity in the *Pah<sup>enu2</sup>* mouse, a model for human PKU.

Jahrestagung der Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM), Innsbruck, 2014

## 5.6 Wissenschaftlicher Werdegang

Name: Gudrun Schlegel  
 Geboren am: 05.10.1984, Freiburg im Breisgau  
 Nationalität: deutsch

### Ausbildung

seit 04/2011	<p><b>Promotion</b></p> <p>bei Prof. Dr. G. M. Rune im Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf</p> <p>„Mentale Retardierung bei Phenylketonurie: Einfluss erhöhter Phenylalaninspiegel auf die synaptische Konnektivität im Hippokampus“</p>
10/2011 – 09/2013	<p><b>Aufbaustudiengang Molekularbiologie</b></p> <p>am Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Universität Hamburg</p>
11/2009 – 04/2010	<p><b>Praktikum</b></p> <p>bei PD. Dr. Luesch am Department for Medicinal Chemistry, University of Florida</p> <p>„Isolation and Characterization of compounds from <i>L. majuscula</i> collected from Key Largo and Key West.“</p>
10/2004 – 08/2009	<p><b>Studium der Pharmazie</b></p> <p>an der Universität Regensburg</p> <p>1. Staatsexamen: 03/2007</p> <p>2. Staatsexamen: 08/2009</p> <p>3. Staatsexamen: 11/2010</p>
06/2004	<p><b>Abitur</b></p> <p>Gymnasium Kolleg St. Sebastian, Stegen</p>



## **Danksagung**

Eine Reihe unterschiedlicher Personen hat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich möchte mich hiermit bei allen herzlich bedanken!

Mein herzlicher Dank geht an Frau Prof. Dr. Gabriele Rune für die Förderung und zuverlässige Betreuung in den letzten vier Jahren, sowie für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Institut für Neuroanatomie anfertigen zu können.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Elke Oetjen, für die Übernahme des Gutachtens und der Betreuung, sowie für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Heisig, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Maison und Herrn PD Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp für die Teilnahme in meiner Prüfungskommission.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. René Santer und bei Herrn Prof. Dr. Kurt Ullrich für die tolle Kooperation und ihr großes Interesse an meinem Projekt.

Ich möchte mich ganz herzlich bei der Niemann-Stiftung für meine finanzielle Förderung während der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Mein Dank geht ganz besonders an Katja. Durch ihre Hilfe und ihren ständigen Rat konnte diese Arbeit zu etwas ganz Besonderem werden. Vielen Dank!

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Kollegen im Institut für Neuroanatomie. Ein besonderes Dankeschön geht an meinen Büropartner Maurice: Danke für deine unermüdliche Hilfe und deine wichtigen Ratschläge fürs Leben. Mein besonderer Dank geht auch an die ‚technischen‘ Mädels: Vielen Dank für eure Hilfe und Unterstützung.

Liebe Familie und Freunde, vielen Dank, dass ihr immer an mich geglaubt habt und mich in meinem Vorhaben unterstützt habt. Vielen Dank Ansgar, für dein Komma-Engagement. Ein besonderer Dank geht an meine Schwester Dagmar, die immer ein offenes Ohr für mich hat, meine Eltern, Claudia und Ludwig, die mich mutig in allem unterstützen und mir immer Hoffnung und neuen Mut geben und an meinen Freund Jannik, der mir immer zur Seite steht und all meine Launen tapfer ertragen hat.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Gudrun Schlegel, geboren am 05.10.1984, an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den ----- 2015

-----  
Gudrun Schlegel