

Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Ulm
Direktor: Prof. Dr. Tobias M. Böckers

**Charakterisierung von drei neuen
SHANK3 Mutationen bei Patienten mit
Autismus und geistiger Behinderung**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Daniela Maria Cochoy
Geburtsort: Kiel

2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. T. M. Böckers

2. Berichterstatter: apl. Prof. Dr. C. von Arnim

Tag der Promotion: 18.05.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Erklärung über die Verwendung publizierter Daten	IV
1 Einleitung	1
1.1 Autismus-Spektrum-Störungen (ASS)	1
1.2 Lokalisation der SHANK Proteine	8
1.3 Aufbau und Funktion der SHANK Proteine	10
1.4 Ergebnisse der bisherigen Erforschung von Mutationen in den <i>Shank</i> Genen in der Zellkultur	13
1.5 <i>Shank</i> Mausmodelle	16
1.6 Ziel dieser Promotionsarbeit	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.2 Methoden	29
2.3 Computerprogramme	40
2.4 Auswertung	40
3 Ergebnisse	45
3.1 Die Grundlage dieser Arbeit	45
3.2 Molekulargenetischer Hintergrund	50
3.3 Western Blot-Analyse	54
3.4 Lokalisationsstudien	56
3.5 Morphologische Untersuchung von Dendriten und Zellsoma	60
3.6 Veränderungen der Spines	65
3.7 Veränderungen der Synapsen	69
4 Diskussion	74
4.1 Lokalisationsstudien	75
4.2 Veränderungen der Neuronenmorphologie	79
4.3 Spinedichte und Spinemorphologie	81
4.4 Exzitatorische und inhibitorische Synapsen	84

4.5	Hypothesen zu Auswirkungen der drei <i>SHANK3</i> Mutationen	86
4.6	Schlussfolgerung	89
4.7	Ausblick	90
5	Zusammenfassung	91
6	Literaturverzeichnis	93

Abkürzungsverzeichnis

ADHS	Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure Rezeptor
ASS	Autismus-Spektrum-Störung
CNVs	Copy number variants
DIV	Day in vitro
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
GFP	Green fluorescent protein
GKAP	Guanvlatkinase assoziiertes Protein
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
PMS	Phelan-McDermid-Syndrom
PSD	Postsynaptische Dichte
PSD-95	Postsynaptische Dichte-95 (Protein)
SAM	Sterile-alpha-motif
SH3	Src homology 3
ZNS	Zentrales Nervensystem

Erklärung über die Verwendung publizierter Daten

Ein Großteil der Daten dieser Promotionsarbeit wurde im April 2015 durch den Verlag „Molecular Autism“ unter unten stehenden Angaben veröffentlicht. Die Nutzung der Abbildungen in dieser Arbeit erfolgt nach Genehmigung des Verlags.

Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).

Cochoy DM, Kolevzon A, Kajiwara Y, Schoen M, Pascual-Lucas M, Lurie S, Buxbaum JD, Boeckers TM, Schmeisser MJ: **Phenotypic and functional analysis of *SHANK3* stop mutations identified in individuals with ASD and/or ID.** Mol Autism 6: 23 (2015).

1 Einleitung

Im Zentrum dieser Promotion steht die morphologische Analyse der Auswirkungen auf Neurone von drei neuen *SHANK3* Mutationen, die bei Patienten mit Autismus-Spektrum-Störungen und geistiger Behinderung identifiziert worden sind. Diese Arbeit soll Einblicke in die komplexen molekularen Pathomechanismen ermöglichen, die *SHANK3* assoziierten Autismus-Spektrum-Störungen zugrunde liegen.

1.1 Autismus-Spektrum-Störungen

Autismus ist nach aktueller Definition kein einheitliches Krankheitsbild, sondern aufgrund der variablen klinischen Ausprägung Teil der sog. Autismus-Spektrum-Störungen (ASS). Die vierte Auflage des *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV) gliedert dieses Spektrum in Einzeldiagnosen auf, darunter finden sich u.a. Autismus-Störungen, das Asperger-Syndrom und der atypische Autismus. Nach DSM-IV definierten sich ASS über die klinische Trias aus 1. Beeinträchtigungen in der wechselseitigen sozialen Interaktion, 2. Einschränkungen in Sprache und Kommunikation und 3. stereotypen, repetitiven Verhaltensweisen. In der Literatur wird sich vielfach auf diese Definition berufen. Seit dem 18. Mai 2013 gilt die in der fünften Auflage des DSM (DSM-V) beschriebene neue Definition von ASS, ohne die oben aufgelisteten Untergruppen. Damit ist z.B. das Asperger-Syndrom als Diagnose entfallen und wird, wie alle anderen Kategorien aus DSM-IV, als ASS bezeichnet. Insgesamt wurde die Spezifität der Diagnose ASS durch diese Änderung verbessert, weil unklar definierte Untergruppen von ASS ausgeschlossen wurden [37]. Die zur Diagnose von ASS notwendigen drei Merkmale wurden auf die folgenden Zwei reduziert: 1. Soziale Kommunikationsstörungen und 2. repetitive Verhaltensweisen und Interessen. Die ursprünglich berücksichtigte Sprachfähigkeit ist bei betroffenen Personen unabhängig von den anderen beiden Merkmalen sehr variabel ausgebildet und deshalb für die Diagnose nicht geeignet [37]. Darüber hinaus zählen das „Insistieren auf Gleichheit“ [31], (z.B. im Tagesverlauf) und ungewöhnliche Antworten auf sensorische Stimuli zu den charakteristischen Merkmalen der ASS [7, 55]. Die Betroffenen entwickeln beispielsweise eine

ungewöhnlich hohe Schmerztoleranz. Eine abnormale Verarbeitung auditiver, visueller oder somatosensibler Informationen kann ausschlaggebend für eine Störung der Sozialisierung und Entwicklung von Kommunikationsfähigkeiten sein [53].

ASS sind neuronale Entwicklungsstörungen, die in den meisten Fällen in den ersten drei Lebensjahren auffällig werden. Bis zu diesem Zeitpunkt durchlaufen die Kinder oft zeitgemäß oder nur leicht verzögert die verschiedenen motorischen und sprachlichen Entwicklungsschritte, die gesunde Kinder auch durchleben. Noch im Kleinkindesalter tritt bei der Mehrheit der betroffenen Kinder eine Regression der bis dahin erlangten Fähigkeiten auf. Man unterscheidet hierbei die Regression der Sprachentwicklung, der sozialen- und motorischen Fähigkeiten und eine allgemeine Regression [6].

Aktueller Studien zur Folge ist ca. 1% der Bevölkerung von ASS betroffen, wobei Männer viermal häufiger als Frauen erkranken. 70% der Patienten gelten gleichzeitig als geistig behindert und ca. 25% leiden parallel zur ASS an Epilepsie [83]. Daran wird deutlich, dass ASS selten isoliert, sondern oft zusammen mit anderen somatischen oder psychiatrischen Erkrankungen auftreten. Weitere häufige Komorbiditäten sind ADHS/Hyperaktivität, gastrointestinale Beschwerden, Schlafstörungen und Angststörungen [42].

Das klinische Bild von ASS ist hoch variabel und reicht von überdurchschnittlich intelligenten bis hin zu schwer geistig behinderten Menschen, die weder sprechen noch laufen können und oft zahlreiche Komorbiditäten aufweisen. Deswegen soll an dieser Stelle auf eine tiefergehende Beschreibung der Patienten verzichtet und stattdessen im Folgenden nur in Einzelfällen auf die Klinik eingegangen werden.

1.1.1 Umweltfaktoren als Auslöser für ASS

Ebenso vielfältig wie die klinischen Ausprägungen von ASS sind deren Ursachen. Während in vielen Fällen keine Ursache bekannt ist, kommen neben genetischen Faktoren auch Umweltfaktoren als Auslöser der Erkrankung infrage [51]. Dazu zählt z.B. das elterliche Alter zum Zeitpunkt der Zeugung bzw. der Schwangerschaft [28]. Männer akkumulieren mit fortschreitendem Alter Punktmutationen in ihrem Erbgut, während bei Frauen mit zunehmendem Alter das Risiko für Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen ansteigt. Adipositas,

Gestationsdiabetes und Hypertonie, sowie die Einnahme von Psychopharmaka während der Schwangerschaft sind ebenfalls mit einem höheren Risiko verbunden, im Ungeborenen eine Prädisposition für ASS zu schaffen [28]. Virale Infektionen, z.B. Röteln, Cytomegalie oder Influenza, können vermutlich über einen immunologischen Prozess im Gehirn zu Entwicklungsstörungen und ASS führen [32, 62]. Kinder mit ASS waren pränatal deutlich häufiger Toxinen, darunter dem Antikonvulsivum Valproat und dem Immunmodulator Thalidomid, ausgesetzt [59, 73]. Da diese Medikamente aber nicht bei allen Exponierten zur Erkrankung geführt haben, geht man von einer zusätzlichen genetischen Prädisposition in den Betroffenen aus [73]. Bei vielen autistischen Kindern konnte ein Zinkmangel festgestellt werden [45, 81]. Da Zinkmangel darüber hinaus für Lern- und Gedächtnisstörungen sowie für Verhaltensauffälligkeiten bekannt ist, schlussfolgerte man, dass ein Zinkmangel an der Entstehung von ASS mitbeteiligt sein könnte [81, 30]. Andere nicht genetische Ursachen sind vermutlich noch zahlreich vorhanden, aber bisher unbekannt. Zumindest muss man das anhand der vielen ASS-Fälle annehmen, für die sich keine genetische Ursache finden lässt.

1.1.2 Genetische Ursachen von ASS

In etwa 20-25% der Fälle können ASS auf genetische Veränderungen zurückgeführt werden. Ca. 80% der genetischen Veränderungen treten sporadisch auf, d.h. es handelt sich um *de novo* Mutationen bei einem familiär bisher unauffälligen Individuum [51]. Anhand hoher Konkordanzraten bei eineiigen Zwillingen geht man von einer Vererbbarkeit von bis zu 90% aus. Dabei ist die Konkordanz nie vollständig, sodass epigenetische und Umweltfaktoren ebenso eine wichtige Rolle spielen müssen [11, 42]. In der Literatur finden sich sehr unterschiedliche Angaben zu bisher bekannten mit ASS in Verbindung stehenden Genen. 103 [9] – 197 [42] Gene gelten gesichert als Autismusgene und bis zu 1000 Gene werden darüber hinaus entfernt mit ASS in Verbindung gebracht [9, 18].

Genetische Risikofaktoren für die Entwicklung von ASS lassen sich in mindestens vier Gruppen unterteilen: 1. ASS verwandte (häufig monogenetische) Syndrome, 2. seltene Chromosomenaberrationen, 3. seltene Copy Number Variants (CNVs) und 4. seltene penetrante monogenetische Mutationen [23]. Zu den ASS

verwandten Syndromen werden u.a. das Fragile-X-Syndrom, das Rett-Syndrom, tuberöse Sklerose, Neurofibromatose, Phenylketonurie, das Angelman-Syndrom, das PTEN Hamatom Tumor-Syndrom und das Phelan-McDermid-Syndrom gezählt [21, 23, 83].

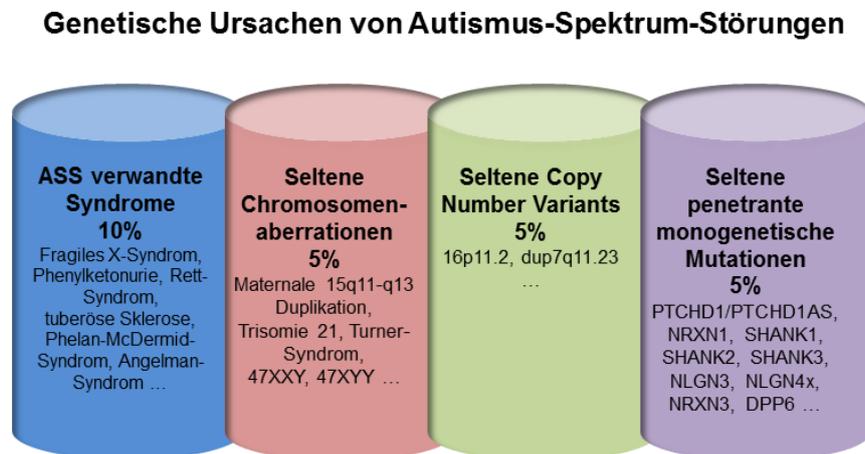


Abb. 1 Vier Gruppen genetischer Ursachen von Autismus-Spektrum-Störungen.

Das Phelan-McDermid-Syndrom (PMS), auch 22q13.3-Deletions-Syndrom genannt, wird an dieser Stelle näher beleuchtet, da nach derzeitigem Kenntnisstand eine Deletion des *PROSAP2/SHANK3* Gens eine der Hauptursachen für den Phänotyp darstellt und dieses Gen im Fokus dieser Arbeit steht. Ursächlich für das Syndrom ist der Verlust eines Teils des langen Arms von Chromosom 22. Die daraus resultierenden Deletionen umfassen bei verschiedenen Patienten unterschiedlich große Abschnitte zwischen 100 Kilobasenpaaren und 9 Megabasenpaaren, was zu einem Verlust verschiedener Gene führen kann. Der entscheidende Genverlust scheint aber derjenige vom *PROSAP2/SHANK3* Gen zu sein, denn nur wenn dieses Gen fehlt oder unterbrochen ist, kommt es zum klinischen Vollbild des Syndroms [65]. Weltweit sind etwa 600 Patienten mit dem PMS bekannt. Diese Zahl dürfte allerdings bei umfassender genetischer Diagnostik von ASS-Patienten weiter ansteigen. Die Hauptsymptome des Syndroms umfassen neonatale Hypotonie als erstes apparentes Symptom nach der Geburt, leichte bis schwere geistige Behinderung, fehlende oder stark beeinträchtigte Sprachentwicklung und leichte Dismorphien. Dazu zählen Dolicocephalie (eine asymmetrisch lange Schädelform), ein flaches Gesicht, lange Wimpern, eine runde Nase mit flachem Nasenrücken, tief liegende Augen, große und z.T. ungeformte Ohren, große, fleischige Hände, ein

Steißbeingrübchen und fehlgeformte Fußnägel. Das Verhalten von PMS-Patienten wird z.T. als autistisch beschrieben. Diese Kinder sind ängstlich, interagieren kaum mit ihrer Umwelt, vermeiden Augenkontakt, zeigen selbststimulierendes Verhalten wie Wippen, Klatschen oder Kauen und ihre Kommunikationsfähigkeit ist stark eingeschränkt. In den ersten drei bis vier Lebensjahren durchlaufen die Kinder entscheidende Entwicklungsschritte wie Krabbeln, Laufen und die ersten Sprachversuche. Über diesen Stand kommen die wenigsten Kinder hinaus bzw. verlieren diese Fähigkeiten ab dem Kleinkindesalter wieder. Nur mit viel Übung und therapeutischem Aufwand können motorische und Sprachfähigkeiten aufrechterhalten werden. Etwa ein Viertel der Patienten entwickelt bis zum Ende der Pubertät Epilepsie. Jeweils ein Viertel der Patienten leidet zusätzlich unter Herz- bzw. Nierenerkrankungen. Über die Lebenserwartung von Menschen mit dem PMS ist noch nichts bekannt. [65]

Seltene chromosomale Aberrationen machen etwa 5% der genetischen Ursachen von ASS aus. Große unbalancierte chromosomale Aberrationen sind gehäuft bei autistischen Patienten mit zusätzlichen morphologischen Veränderungen zu finden [23]. Mit einem Anteil von 1-3% aller ASS-Patienten ist die Duplikation von 15q11-q13 (Angelman-/Prader-Willi-Syndrom) die häufigste Aberration [5]. Trisomie 21, das Turner-Syndrom und die Karyotypenveränderungen 47, XYY und 47, XXY können auch zu autistischen Phänotypen führen [23, 9]. Die Chromosomen 16, 17, und 7 sind vergleichsweise häufig von Duplikationen oder Deletionen betroffen, die bei Patienten autistische Phänotypen hervorrufen [25, 23].

Die vier Untergruppen der genetischen Pathologien sind schwer voneinander zu trennen. Bei CNV, der dritten Untergruppe, handelt es sich letztlich ebenfalls um Duplikationen oder Deletionen von Genmaterial, sodass es hier Überlappungen zur Gruppe der chromosomalen Aberrationen gibt. Je nach Größe des betroffenen Genabschnitts, können für ein oder mehrere Gene partielle Monosomien oder Trisomien vorliegen, was zu sog. Gen-Dosis-Effekten führen kann. Sowohl mehr, als auch weniger Genmaterial kann zu Dysbalancen zellulärer Abläufe und somit zur phänotypischen Ausbildung einer Krankheit führen. CNVs in Autismus assoziierten Genen kommen drei- bis fünfmal häufiger in ASS-Familien als in Kontrollfamilien vor [23], wobei sie nicht bei allen Familienmitgliedern zur Ausbildung von ASS führen [18]. Dieser Fakt deutet also auch hinsichtlich der

Einleitung

Untergruppe der CNVs auf eine große Variabilität der Expressivität und auf Einflüsse aus der Umwelt hin.

Die letzte Gruppe der genetischen Veränderungen bei ASS-Patienten ist für diese Arbeit die bedeutendste, da die hier untersuchten Mutationen dieser Gruppe zuzuordnen sind. In Kopplungsstudien und Screeninguntersuchungen hat man Mutationen in bestimmten Genen für ASS verantwortlich machen können. Dazu zählen u.a. *Neurologin 3 (NLGN3)* und *Neurologin 4 (NLGN4)* auf dem X-Chromosom, *Neurexin 1 (NRXN1)* auf Chromosom 2p16, *Contactin associated Protein-like 2 (CNTNAP2)* auf Chromosom 7q35, *PROSAP3/SHANK1* auf Chromosom 19q13.3, *PROSAP1/SHANK2* auf Chromosom 11q13.2 und *PROSAP2/SHANK3* auf Chromosom 22q13.3 [44, 27, 1]. Viele punktmutierte Gene, die zu einem autistischen Phänotyp führen, kodieren Proteine, die v.a. in Bildung und Plastizität exzitatorischer Synapsen involviert sind. CNVs oder *de novo* Punktmutationen in den *PROSAP/SHANK* Genen kommen in ca. 1% aller Patienten mit ASS vor [54]. Damit zählt es zu den am häufigsten mutierten, Autismus assoziierten Genen, wobei der Großteil mit 0,5%-0,73% auf *PROSAP2/SHANK3* entfällt [10, 54]. Der Doppelname dieses Gens leitet sich aus seinen funktionellen Proteindomänen ab. *PROSAP* steht für *proline-rich synapse-associated protein* [12] und *SHANK* ist zurückzuführen auf *SH3 domain and ankyrin repeat-containing protein* [80, 60]. Im Folgenden wird auf den Doppelnamen dieses Gens verzichtet und nur noch *SHANK* verwendet.

Auch wenn sich ASS als Phänotyp einer Vielzahl von genetischen Veränderungen darstellt und damit scheinbar kein der Krankheit alleinig zugrunde liegendes Muster zu erkennen ist, lassen sich zwei Gruppen von neuronalen Funktionen erkennen, mit denen viele mutierte Gene und Mutationsarten zusammenhängen könnten. Die eine Gruppe umfasst Mutationen wie sie der Neurofibromatose oder der tuberösen Sklerose zugrunde liegen, die den mTOR/PI3K-Signalweg beeinflussen und zu veränderten Wachstumsraten der Neurone führen. Zu der anderen Gruppe werden Mutationen in den *Neurologin* oder *SHANK* Genen gezählt, die Einfluss auf die Synapsenfunktion, Synaptogenese und die Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Eingängen zum Neuron ausüben [15]. Auswirkungen dieser zwei beeinträchtigten Funktionen lassen sich zum Teil auch in der makroskopischen Neuroanatomie wiederfinden.

1.1.3 Neuroanatomische Veränderungen bei Patienten mit ASS

Die Theorie des vermehrten Neuronenwachstums über einen dysregulierten mTOR/PI3K-Signalweg erhält dadurch Unterstützung, dass 10-30% der ASS-Patienten eine Makrocephalie aufweisen und in MRT-Untersuchungen autistischer Patienten eine Zunahme des Hirnvolumens festgestellt werden konnte [2]. Für den Ansatz einer Imbalance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen neuronalen Eingängen (E/I-Imbalance) spricht die Tatsache, dass ein Viertel der ASS-Patienten unter Epilepsie leidet, welche ebenfalls einer E/I-Imbalance zugeschrieben wird [19].

MRT-Untersuchungen konnten zeigen, dass vor allem die weiße Substanz zur Volumenzunahme des Gehirns beiträgt [2]. Kemper und Bauman haben die ersten systematischen postmortalen Untersuchungen an autistischen Patienten durchgeführt und fanden als einzige Auffälligkeit im Kortex einen ungewöhnlich grobkörnigen Gyrus Cinguli mit verminderter Ausbildung bzw. Untergliederung der Laminae [50]. Der Gyrus Cinguli ist eine Gehirnregion, die in Impulskontrolle, Entscheidungsfindung, emotionale Prozesse und komplexe Problemlösungen involviert ist [48], sodass Veränderungen in dieser Region sowohl mit den repetitiven Verhaltensweisen als auch mit Einschränkungen im sozialen Miteinander in Verbindung gebracht werden können [50]. Darüber hinaus konnte eine Gesamtzunahme des kortikalen Durchmessers, eine Zunahme der Neuronendichte und eine irreguläre Laminierung des Kortex nachgewiesen werden [4]. Bei autistischen Kindern und Jugendlichen deutete eine Vergrößerung der Amygdala auf einen Zusammenhang mit der oftmals beobachteten erhöhten Ängstlichkeit hin [47]. Ebenso könnte die motorische Unterentwicklung vieler autistischer Kinder mit beschriebenen Veränderungen im Kleinhirn in Zusammenhang stehen. Auch im Hippocampus, einer Hirnregion, die für Lernen und Gedächtnisbildung eine entscheidende Rolle spielt, wurden Volumen- und Formveränderungen gefunden, die aber noch weiterer Untersuchungen bedürfen, weil sich die Aussagen darüber z.T. widersprechen.

Die mit Autismus assoziierten SHANK Proteine werden in den oben genannten Hirnregionen z.T. stark exprimiert. SHANK1 kommt ausschließlich im Gehirn vor, während SHANK2 und 3 auch in Geweben außerhalb des ZNS exprimiert werden [80, 67, 56]. Die drei Proteine sind in verschiedenen Hirnregionen unterschiedlich

stark vertreten, im Kortex und im Hippocampus sind sie aber alle vorhanden [12]. Darauf basierend kann man die Hypothese aufstellen, dass die Fehlfunktion eines der SHANK Proteine die oben genannten Veränderungen mit herbeiführen könnte. Der Fokus soll im Folgenden auf diese Proteinfamilie gelenkt und ihre Lokalisation, ihre Funktion und ihr Aufbau beleuchtet werden.

1.2 Lokalisation der SHANK Proteine

Die *SHANK* Gene kodieren Gerüstproteine der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen [12, 60]. Ein Neuron bildet über sein Axon Präsynapsen mit anderen Neuronen aus und empfängt an seinen Dendriten über seine Postsynapsen Signale anderer Neurone. Postsynapsen, die exzitatorische Signale empfangen, sind an den Spitzen von sog. Spines (Ausstülpungen der Dendriten) lokalisiert [16]. Inhibitorische Signale werden hingegen an Postsynapsen übermittelt, die sich direkt am Dendritenschaft oder am Zellsoma befinden und einen ganz anderen Aufbau und Proteingehalt als exzitatorische Postsynapsen aufweisen [70]. Elektronenmikroskopisch stellt sich die Postsynapse einer exzitatorischen Synapse als eine diskusförmige, elektronendichte Struktur dar, die deswegen auch als postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet wird [36].

1.2.1 Die PSD

Die Größe der PSD ist abhängig von der Anzahl der in ihr enthaltenen Glutamatrezeptoren und der Größe des Spines, an dessen Spitze sie sich befindet [49]. Durchschnittlich umfasst sie 300-400 nm im Durchmesser und reicht ca. 30-60 nm in die Spinetiefe [20]. Zu den Membranproteinen der PSD gehören zentral gelegen vor allem die ionotropen AMPA- und NMDA-Glutamatezeptoren sowie die metabotropen Glutamatrezeptoren, die hauptsächlich in der Peripherie der PSD liegen. Über Neuroligine auf der postsynaptischen und Neurexine auf der präsynaptischen Seite findet eine direkte transsynaptische Verbindung zweier Neurone statt, die auf beiden Seiten über jeweils post- bzw. präsynaptische Gerüstproteine verankert wird. Auch andere Proteine, darunter N-Cadherine und Integrine, können den synaptischen Spalt überwinden und tragen zur Ausbildung stabiler Synapsen bei. Die PSD dient dem Aktinzytoskelett des Spines als Verankerung und beinhaltet neben GTPasen und deren Regulatoren

Einleitung

Kinasen/Phosphatasen, die in der Signaltransduktion der neuronalen Informationsübertragung eine wichtige Rolle übernehmen. Ein Großteil des Proteingehalts der PSD wird durch Gerüstproteine gebildet. Beispiele für diese Proteingruppe sind PSD-95 (auch als SAP90 bekannt), GKAP (Guanylatkinase assoziiertes Protein, auch als SAPAP bekannt), Homer und SHANK. Die genannten Proteine repräsentieren jeweils ganze Proteinfamilien und teilen die Eigenschaft, zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen ausbilden zu können. Dazu befindet sich in vielen Gerüstproteinen eine sog. PDZ-Domäne, über die Interaktionen mit dem C-terminalen Ende von anderen Proteinen hergestellt werden können [70, 76].

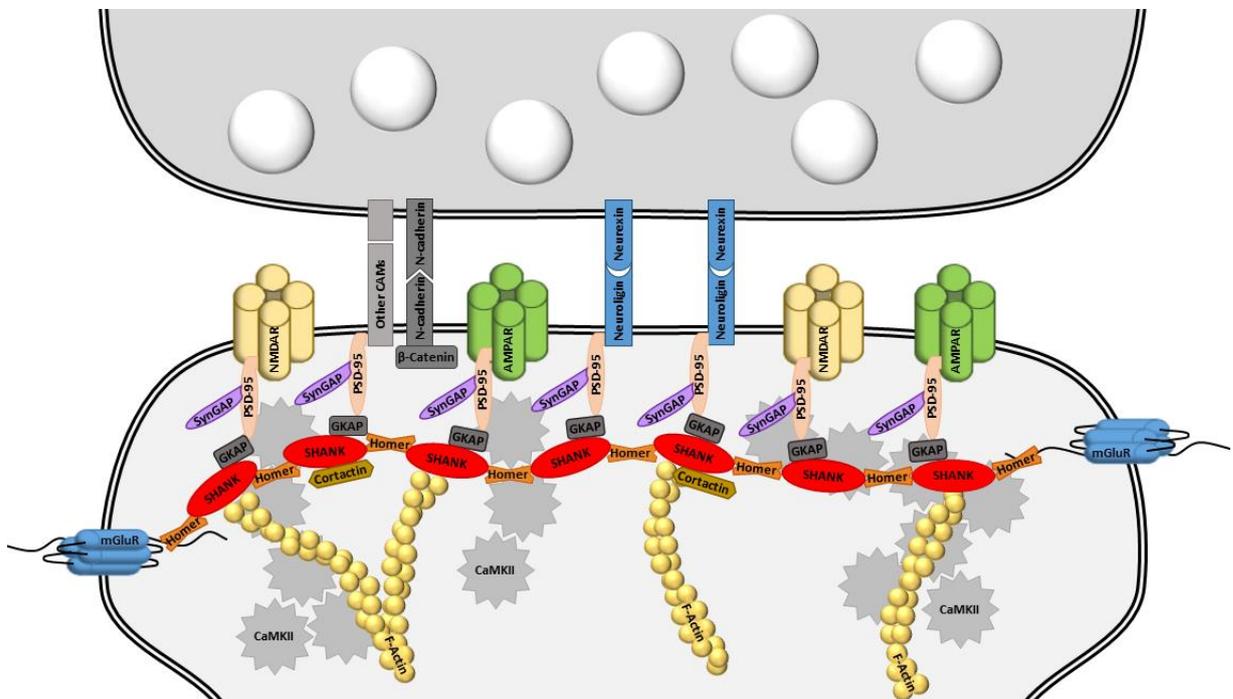


Abb. 2 Überblick über die molekulare Struktur der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Neurone. NMDAR: N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor, AMPAR: α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure Rezeptor, CAMs: engl. Cell adhesion molecules, PSD-95: Postsynaptische Dichte-95 (Protein), SynGAP: Synaptisches Ras GTPase aktivierendes Protein, GKAP: Guanylatkinase assoziiertes Protein, mGluR: Metabotroper Glutamaterezeptor, F-Actin: Filamentäres Actin, CaMKII: Calmodulin abhängige Proteinkinase II.

In Abhängigkeit von der synaptischen Übertragung werden die Komponenten der PSD in Minuten- bis Tageszeiträumen angepasst, abgebaut und wieder aufgebaut. Vor allem AMPAR können bedarfsabhängig schnell ihre Lokalisation in der Zellmembran verlassen bzw. dahin zurückkehren. Darin vermutet man, dem Mechanismus von Lernen und neuronaler Plastizität näher zu kommen, da Lernen

auf sog. Langzeitpotenzierung bzw. LTP beruht, was im Prinzip die dynamische Verstärkung der synaptischen Übertragung durch AMPAR bedeutet [70]. Um das Zusammenwirken der verschiedenen Proteine in der PSD zu erläutern, soll die zentrale Rolle, die die Gerüstproteinfamilie der SHANKs einnimmt, anhand des Proteinaufbaus und seiner Interaktionen dargestellt werden.

1.3 Aufbau und Funktion der SHANK Proteine

Wie in vorangegangenen Abschnitten schon erwähnt, setzt sich diese Proteinfamilie aus drei Mitgliedern zusammen, SHANK1, SHANK2 und SHANK3, die durch alternatives Splicen wieder in einzelne Isoformen unterteilt werden können. Im Wesentlichen wird in dieser Arbeit auf SHANK3 Bezug genommen, da es drei Viertel aller durch *SHANK* Mutationen verursachten Autismusfälle bedingt [54]. Zu den hochkonservierten Regionen in *SHANK* zählt die PSD-95/Discs-large/Zona occludens1 (PDZ)-Domäne, die, vermittelt über PSD-95 und GKAP, SHANK mit ionotropen NMDA-Rezeptoren verbindet. Im Gegensatz zu dieser indirekten Stabilisierung können AMPA-Rezeptoren sowohl direkt über die PDZ-Domäne als auch indirekt über Stargazin, PSD-95 und GKAP mit SHANK interagieren. Für metabotrope Glutamatrezeptoren wie mGluR1 oder mGluR5 sind hingegen ausschließlich indirekte Interaktionen mit SHANK über Homer beschrieben [75]. Homer und SHANK sind über die C-terminal gelegene Homer-binding-site miteinander verbunden und bilden ein netzartiges Gerüst, das die gesamte PSD durchzieht und stabilisiert. Isoformen von SHANK1 und 3 weisen N-terminal Ankyrin-repeats auf, die wiederum Anbindungsstelle für Alpha-fodrin sind, ein Protein, das mit F-Aktin assoziiert ist. Über die Bindungspartner Abp1 und Cortactin bestehen weitere Verbindungen zwischen SHANK und F-Aktin. Damit kann SHANK als Bindeglied zwischen dem Aktinzytoskelett und den membranständigen Glutamatrezeptoren angesehen werden. SHANK interagiert nicht nur mit einer Vielzahl an PSD-Proteinen, sondern kann auch innerhalb der eigenen Proteinfamilie dimerisieren. Mögliche Bindungsdomänen untereinander sind SAM-SAM (Sterile-alpha-motif) und Ankyrin-repeats-SH3-Domäne (Src-homology-3- Domäne) [76, 34, 69, 70]. Die Dimerisierung von SHANK2 und 3 in der PSD wird maßgeblich durch Zinkionen beeinflusst, die entweder mit dem Neurotransmitter aus präsynaptischen Vesikeln die Postsynapse erreichen oder

Einleitung

sich bereits im Dendriten befinden und an die SAM-Domäne von SHANK binden [33]. Zinkmangel führt zu einer deutlichen Abnahme der PSD-Dicke und zu einer Translokation von PSD-Proteinen aus der Postsynapse heraus in den Dendriten. Dies deutet darauf hin, dass die glutamaterge Transmission die PSD-Struktur über deren Zinkgehalt mitreguliert [39, 33]. Für die postsynaptische Lokalisation von SHANK wird die SAM-Domäne verantwortlich gemacht, die zusammengefasst mit der Homer-binding-site auch als „Synaptic targeting/assembly Element“ bezeichnet wird [13].

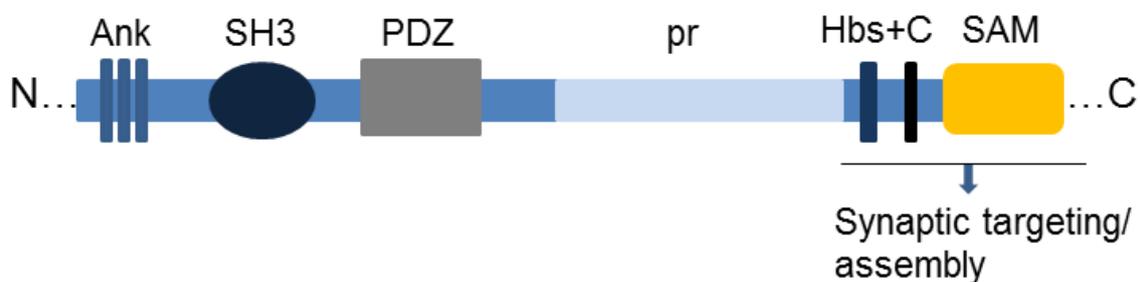


Abb. 3 Aufbau von SHANK3, Isoform a. Ank: Ankyrin-repeats; SH3: Src-homology-3-Domäne; PDZ: PSD-95/Discs-large/Zona-occludens1; pr: Proline-reiche Region; Hbs: Homer-binding-site; C: Cortactin-binding-site; SAM: Sterile-alpha-motif.

Auch die Präsynapse steht über mehrere Bindeglieder mit SHANK in Verbindung. SHANK kann entweder direkt oder indirekt über PSD-95 und GKAP mit Neuroliginen interagieren, die selber wiederum eine feste Bindung mit dem präsynaptischen Neurexin eingehen [56, 58].

Um weitere Funktionen von SHANK, vor allem SHANK3, zu erforschen, bediente man sich oft eines Modells, in dem SHANK fehlte. Anhand der veränderten Morphologie und Funktion der SHANK defizienten Neurone ließen sich Rückschlüsse auf die Funktionen von SHANK ziehen. An späterer Stelle werden diese Modelle näher vorgestellt, im Folgenden soll es zunächst um die daraus abgeleiteten Funktionen von SHANK gehen.

Im Gegensatz zu SHANK1 und 2, die schon in der frühen postnatalen Gehirnentwicklung weit verbreitet sind, steigt die Expressionsrate von SHANK3 erst langsam in den ersten zwei Lebenswochen vor allem im Striatum, Hippocampus, Cerebellum und Schicht 1 und 2 des Neokortex an [14]. Die höchsten Expressionsraten von SHANK3 treten zu Zeitpunkten wichtiger

Entwicklungsschritte auf, die mit synaptischer Plastizität und erfahrungsabhängigem Lernen im Zusammenhang stehen [14]. SHANK Proteine gehören außerdem zu den ersten Proteinen, die in der PSD erscheinen und sind damit noch bevor PSD-95 und NMDAR in die PSD transportiert werden vor Ort [12]. Schon aus diesen Ergebnissen ließ sich schließen, dass das SHANK Gerüst primär in die Rekrutierung, Bindung und funktionelle Kopplung von PSD- bzw. Transmembranproteinen involviert ist [76]. Durch die Möglichkeit über verschiedene Adapterproteine Elemente des Aktinzytoskeletts zu reorganisieren, kommt SHANK eine entscheidende Rolle im aktivitätsabhängigen Umbau von Synapsen zu [76]. Untersuchungen von Roussignol et al. (2005) ergaben, dass überexprimiertes Shank3 dazu in der Lage ist, in Neuronen, die endogen keine Spines besitzen, Spines zu induzieren. Shank3 rekrutiert alle für die Spinogenese notwendigen Moleküle und baut am Ende einen Spine mit einer funktionsfähigen Synapse auf [69]. Verschiedene Domänen von SHANK3 sind in diese Schritte involviert. So wird postuliert, dass SHANK3 erst über seine Homer-binding-site in den Dendrit gelangt und dort über diese Region u.a. metabotrope Glutamatrezeptoren rekrutiert [69]. Die C-terminal gelegene Cortactin-binding-site und die Ankyrin-repeats tragen zur Spinereifung bei. Über Interaktionen mit F-Aktin kontrolliert die Cortactin-binding-site die Spineretraktion, sowie die Verbreiterung des Spineköpfchens. Die Ankyrin-repeats führen, vermittelt durch die Zytoskelettkomponente Alpha-fodrin, ebenfalls zur Verbreiterung des Spines [69]. Die PDZ-Domäne spielt dabei nicht zuletzt wegen ihrer direkten und indirekten Bindung von Glutamatrezeptoren eine Rolle in der Spinereifung.

Laut derzeitigem Kenntnisstand ist SHANK2 das erste SHANK Protein, das in der PSD erscheint. Dem folgt SHANK3 und erst später in der Synapsenentwicklung erscheint SHANK1. Daraus schließt man, dass den zuerst genannten SHANKs sehr wahrscheinlich eine Rolle in der Neuentstehung von Spines und Synapsen zukommt, während SHANK1 an deren Ausreifung maßgeblich beteiligt ist [33].

Untersuchungen von Duffney et al. (2013) zufolge nahmen in Shank3 defizienten Neuronen die NMDAR vermittelten Ströme durch eine reduzierte Anzahl an Oberflächenrezeptoren ab. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass SHANK3 essentiell für den Rezeptorbesatz und damit für die neuronale Transmission ist [24]. Ein Zusammenhang zwischen SHANK und den NMDAR besteht einerseits

über deren indirekte Verbindung und andererseits über das SHANK regulierte Aktinzytoskelett, da für die Öffnungswahrscheinlichkeit von NMDAR und den Transport in die Zellmembran die Integrität des Aktinskeletts Voraussetzung ist [68]. Auch die neuronale Transmission über AMPAR hängt mit großer Wahrscheinlichkeit von deren Rekrutierung und Stabilisierung durch SHANK3 ab [69]. Ein Knockdown von *Shank3* in Neuronen hat darüber hinaus in Untersuchungen von Verpelli et al. (2011) dazu geführt, dass auch die Level metabotroper Glutamatrezeptoren (mGluR5) auf Proteinebene vermindert waren. Zusammenfassend lässt sich somit über die Rolle, die die SHANKs in der PSD einnehmen sagen, dass diese Moleküle sowohl „Downstream-Effekte“, wie z.B. das Zytoskelett, als auch „Upstream-Effekte“, wie z.B. Glutamatrezeptoren sowie transsynaptische Neuroligin-Neurexin Interaktionen, modulieren [34].

1.4 Ergebnisse der bisherigen Erforschung von Mutationen der *Shank* Gene in der Zellkultur

Wie eingangs erwähnt, kommen Mutationen in *SHANK* mit einer Häufigkeit von ca. 1% bei Patienten mit ASS vor [54]. Die klinische Ausprägung der *SHANK* Mutationen ist variabel und wurde bislang vor allem im Zusammenhang mit dem *SHANK3* 22q13.3-Deletions-Syndrom (PMS) untersucht. Dabei sind Mutationen in *SHANK* nicht nur mit Autismus assoziiert, sondern werden auch bei Patienten mit anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie und bipolarer Störung gefunden [34, 38]. Die Tatsache, dass gleich drei bzw. vier (wenn man geistige Behinderung als häufige Komorbidität mitzählt) neuropsychiatrische Krankheitsbilder von *SHANK* Mutationen verursacht werden können, spricht für *SHANK* assoziierte Pathomechanismen, die sich wohlmöglich global auf das ZNS mit nachfolgender, klinisch individuell ausgeprägter Fehlfunktion auswirken.

Die molekularen Auswirkungen der Mutationen bleiben nach der Analyse der Patientensymptome ungeklärt und bedürfen eines Modells, das man beliebig variieren und auf molekularer Ebene untersuchen kann. Das einfachste Modell, das der Forschung bisher zur Verfügung steht, ist die Zellkultur, bestehend aus Zelllinien oder primären Neuronen. Ziel dieser Forschung ist es, molekulare neuroanatomische Veränderungen, die durch Mutationen in *SHANK* verursacht

Einleitung

werden zu beschreiben, zu evaluieren und daraus einen möglichen Pathomechanismus abzuleiten.

Diese Promotionsarbeit orientiert sich an etablierten Zellkulturstudien und soll helfen, molekulare Veränderungen neu entdeckter, bislang uncharakterisierter *SHANK3* Mutationen aufzudecken. Anhand der Ergebnisse von vier Arbeitsgruppen soll im Folgenden der aktuelle Stand der Zellkulturforschung über *SHANK3* Mutationen zusammengefasst werden.

Die Arbeitsgruppe von Nathalie Sans [26] untersuchte vier Mutationen im *SHANK3*-Rattenhomolog, darunter eine auf einer Insertion beruhende Stopp-Mutation, die in der Prolin-reichen Region zum Proteinabbruch führt (*Shank3 stop* und später von Arons et al. 2012 „InsG“ genannt), sowie drei Punktmutationen in den Ankyrin-repeats (R12C, R300C, Q321R). In der Zelllinie COS-7 lokalisierten die Produkte der Ankyrin-repeat-Mutationen ähnlich wie das Wildtyp-Shank3 in die Zellmembran und bildeten große intrazelluläre Cluster. Die Stopp-Mutation führte zu einem Abbruchprotein, das im Bereich des Zellkerns abgelagert wurde und nicht membranständig zu finden war. Während dieser Lokalisationsstudie fiel den Untersuchern eine Kolo-kalisation von Shank3 mit Aktinfilamenten auf, die in geringerem Maß auch für die Ankyrin-repeat-Mutations-Proteine beobachtet werden konnte. „Shank3 stop“ kolokalisierte jedoch nicht mit F-Aktin. In hippocampalen Neuronen lokalisierten alle untersuchten Shank3 Proteine mit Ausnahme von „Shank3 stop“ synaptisch, während Letzteres ausschließlich im Zellsoma blieb. Shank3 und die drei Ankyrin-repeat-Mutations-Proteine waren dazu in der Lage, die Spinedichte zu erhöhen und die Anzahl an Filopodien (langen, unreifen Spinevorläufern) zu verringern. „Shank3 stop“ verringerte hingegen signifikant die Spinedichte an Dendriten. Auch der Reifegrad der Spines war unter Präsenz von „Shank3 stop“ dahingehend verändert, dass es weniger ausgereifte, pilzförmige Spines mit breiten Köpfchen gab. Überexpression von Shank3 ließ im Vergleich zur Kontrolle mehr pilzförmige Spines am Dendriten entstehen. Parallel zur Anzahl ausgereifter Spineformen war der Gehalt an F-Aktin in den Synapsen der Shank3 überexprimierenden Neurone erhöht. Da aber keine Erhöhung der F-Aktinlevels in Neuronen gemessen werden konnte, die die Ankyrin-repeat-Mutations-Proteine überexprimierten, schlossen die Autoren bei den untersuchten *Shank3* Mutationen auf einen Aktin-abhängigen Mechanismus,

die Spinereifung zu beeinträchtigen. Auch wenn Shank3 bis dato nicht in Präsynapsen zu finden ist, scheint es während der neuronalen Entwicklung auch in axonalen Wachstumskegeln, sog. Growth Cones, vorzukommen. Überexpression von Shank3 in jungen hippocampalen Neuronen führte zu einer erhöhten Mobilität dieser Growth Cones, was sie dazu befähigte, mit anderen Neuronen in Kontakt zu treten. Keines der Mutations-Proteine konnte jedoch die Motilität der Growth Cones in Neuronen erhöhen.

In Arons et al. (2012) [3] bestätigte und erweiterte die Arbeitsgruppe von Craig Garner die Experimente mit diesen vier Mutationen. Im Gegensatz zum Wildtyp-Shank3 war keine der Mutationen in der Lage, den Gehalt an Homer1, einem wichtigen Bindungspartner von SHANK, in der PSD zu erhöhen. Präsynaptische Veränderungen zeigten, dass die durch Neuroligin und Neurexin vermittelte transsynaptische Signalübertragung bei Überexpression der Mutationsproteine beeinträchtigt war. Gemessen am VGluT1-Signal, einem präsynaptischen Vesikelprotein, konnte zudem eine deutliche Verringerung präsynaptischer Glutamatvesikel festgestellt werden. Darüber hinaus war auch die VGluT1-Dichte, d.h. die Anzahl exzitatorischer Synapsen, entlang der Dendriten reduziert. Die Messung von mEPSCs (miniature excitatory postsynaptic currents) ergab eine signifikante Abnahme der Amplituden von AMPAR und NMDAR, was darauf hindeutete, dass sich der verminderte Transmittergehalt der Präsynapse sowie die reduzierte Synapsendichte schließlich auch auf die neuronale Transmission auswirken.

Die dritte Arbeitsgruppe von Guy Rouleau konnte in Gauthier et al. (2010) [29] *SHANK3* Mutationen bei schizophrenen Patienten mit geistiger Behinderung identifizieren. Es handelte sich um eine Abbruchmutation in der Prolin-reichen Region (R1119X) und eine Missense-Mutation kurz nach der SH3-Domäne (R536W). Es wurden *Shank3*-Knockout Zebrafische hergestellt, die einen schwimmunfähigen Phänotyp aufwiesen. Diesem Phänotyp wurde in Rescue-Experimenten die Wildtyp-*Shank3* DNA-Sequenz oder die DNA-Sequenzen der Missense-Mutationen oder der Stopp-Mutation R1119X injiziert. Während *Shank3* den Normalzustand komplett und die Missense-Mutation ihn nur partiell wiederherstellen konnte, behielten die mit der Stopp-Mutation injizierten Fische den Knockout-Phänotyp. Mit dem *Shank3* Konstrukt transfizierte hippocampale

Neurone wiesen ein verstärktes Neuritenwachstum auf. In den Mutationsneuronen wurde das Wachstum der Neuriten kaum bis gar nicht gefördert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Stopp-Mutation R1119X als loss-of-function-Mutation beschrieben.

Dieselbe Mutation war Untersuchungsgegenstand in der Publikation von Grabrucker et al. (2013) [35]. In einer Lokalisationsstudie in hippocampalen Neuronen und NIH-Zellen konnte die Arbeitsgruppe die nukleäre Lokalisation des mutierten Proteins sowohl über die Fluoreszenzmikroskopie als auch biochemisch nachweisen. Die Anzahl der Primär- und Sekundärdendriten war im Vergleich zum Wildtyp-*Shank3* signifikant verringert, ebenso wie die Anzahl reifer Synapsen. Der endogene *Shank3* Gehalt in den Synapsen war in Neuronen, die mit der R1119X Mutation transfiziert worden waren signifikant verringert, was auf eine Beeinträchtigung der *Shank* Expression des gesunden Allels bzw. der gesunden Gene im Modellneuron hindeutet. Abschließend wurden die Verhältnisse der exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen ausgewertet. Während *Shank3* die exzitatorischen Synapsenzahlen erhöhen konnte, wurden sie durch die Transfektion mit der R1119X Mutation signifikant verringert. Die inhibitorischen Synapsenzahlen blieben im Vergleich zur Kontrolle bei beiden Varianten unverändert. Daraus folgte die Arbeitsgruppe, dass die R1119X Mutation möglicherweise zu einer Imbalance von exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen führt, die eine vermehrte Inhibition der mutierten Neurone zur Folge haben könnte.

1.5 *Shank* Mausmodelle

Die Zellkultur liefert nur bis zu einer bestimmten Grenze aufschlussreiche Ergebnisse. Neurone in Kultur sind aus ihrem natürlichen Verbund im embryonalen Rattengehirn herausgelöst und müssen sich unter Kulturbedingungen in künstlichen Nährmedien entwickeln. Dabei erhalten sie nicht die Stimuli, denen heranwachsende Neurone in einem Lebewesen ausgesetzt sind. Ein höheres bzw. „natürlicheres“ Modell, um *SHANK* Mutationen zu untersuchen ist das lebendige, genetisch veränderte Tier. Zu allen drei *SHANK* Familien wurden bereits Mausmodelle mit verschiedenen, Patienten

Einleitung

nachempfundenen Mutationen generiert und hinsichtlich ihres Verhaltens sowie ihrer Morphologie untersucht. Da in dieser Arbeit Zellkulturexperimente mit *SHANK3* Mutationen durchgeführt wurden, sollen an dieser Stelle nur die bisherigen *Shank3* Mausmodelle vorgestellt werden. *Shank1* und *Shank2* Modelle werden hier nicht zum Vergleich von *SHANK3* Pathologien herangezogen.

Shank3 Modelle

Sieben unterschiedliche *Shank3* Mausmodelle wurden bisher von verschiedenen Arbeitsgruppen charakterisiert. Sechs dieser Modelle trugen Mutationen im *Shank3* Gen, die zu einem Verlust von *Shank3* Isoformen führten. Die aktuellste Publikation von Han et al. 2013 [41] stellte ein Mausmodell mit einer Überexpression von *Shank3* vor. Nicht alle Modelle wurden nach denselben Parametern hin untersucht und die Experimente, die von allen Arbeitsgruppen durchgeführt wurden, ergaben z.T. unterschiedliche Ergebnisse. Ein Grund dafür ist in der Untersuchung verschiedener Hirnregionen zu sehen. Außerdem wurden die Modelle zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten untersucht. Um einen Überblick über die sechs Deletionsmodelle zu geben, wurde nach dem Vorbild von Jiang et al. 2013 [46] eine tabellarische Form gewählt.

Einleitung

Tab. 1 Zusammenfassung der ersten drei Shank3 Deletions-Mausmodelle

Referenz	Bozdagi et al.,2010 Yang et al.,2012	Wang et al., 2011	Peça et al., 2011
Deletierte Exone/Domänen	Exon 4-9 ^B , Ankyrin-repeats	Exon 4-9 ^J , Ankyrin-repeats	Exon 4-7, Ankyrin-repeats
Vorhandene Isoformen	<i>Shank3c,d,e,f</i>	<i>Shank3c,d,e,f</i>	<i>Shank3c,d,e,f</i>
Deletierte Isoformen	<i>Shank3a,b</i>	<i>Shank3a,b</i>	<i>Shank3a,b</i>
Veränderte synaptische Proteine	Reduktion von GluA1 (im Hippocampus CA1).	Reduktion von GKAP, Homer1b/c, GluA1, GluN2A (im Gesamthirn).	Keine Angaben.
Gehirn- und Synapsenmorphologie	CA1 Hippocampus: Aktivitätsabhängiges Spine-Remodeling ↓	CA1 Hippocampus: Längere Spines, Spinedichte ↓	Keine Angaben.
Soziales Verhalten	In Männchen-Weibchen-Interaktionen vermindertes Schnüffeln der Männchen. Leichte soziale Beeinträchtigung von Jungtieren, normaler Three Chamber Test in erwachsenen Tieren	Vermindertes Interesse an fremden Tieren. Verminderte soziale Interaktionen.	Normale Initiation von sozialer Interaktion. Geringere Beachtung von Fremdtieren im Three Chamber Test.
Repetitives Verhalten	Verstärktes Putzen. Unflexibles Verhalten im wiederholten Water Maze Test.	Verstärktes Putzen. Stereotype Objektmanipulation im Novel Object Test.	Kein verstärktes Putzen.
Lernen und Gedächtnis	Verminderte Wiedererkennung von Objekten. Normale Angstkonditionierung.	Vermindertes Lang- und Kurzzeitgedächtnis.	Keine Angaben.

Einleitung

Tab. 2 Zusammenfassung der letzten drei Shank3 Deletions-Mausmodelle

Referenz	Peça et al., 2011	Schmeisser et al. 2012	Kouser et al. 2013
Deletierte Exone/Domänen	Exon 13-16, PDZ-Domäne	Exon 11, SH3-Domäne	Exon 21, Homer-Bindig-site
Vorhandene Isoformen	<i>Shank3e,f</i>	<i>Shank3d,e,f</i>	Unsichere Angabe.
Deletierte Isoformen	<i>Shank3a,b,c,d</i>	<i>Shank3a,b,c</i>	Unsichere Angabe.
Veränderte synaptische Proteine	Reduktion von GKAP3, Homer1, PSD-93, GluA2, GluN2A, GluN2B (im Striatum).	Vermehrtes GluN2B (im Hippocampus) und Shank2 (im Striatum).	Erhöhte mGluR5-Level (im Hippocampus).
Gehirn- und Synapsenmorphologie	Striatum: Zunahme in striatalem Volumen und Dendritenlänge. Abnahme der Spinedichte, Länge und Dicke der PSD.	Keine Veränderungen im Hippocampus, CA1.	Keine Veränderungen in Spinedichte und Komplexität des Dendritenbaums.
Soziales Verhalten	Geringere Beachtung von Fremdtieren im Three Chamber Test. Verminderte Interaktion „Nase zu Nase“ und weniger anogenitales Beschnüffeln.	Keine Angaben.	Kein Interesse an neuen Gegenständen und erhöhtes Vermeidungsverhalten im dark/light Task. Minimale Defizite in der sozialen Interaktion.
Repetitives Verhalten	Verstärktes Putzen bis zur Verletzung der Haut.	Verstärktes Putzen bis zur Verletzung der Haut.	Verstärktes Putzen älterer Mäuse.
Lernen und Gedächtnis	Keine Auffälligkeiten.	Keine Angaben.	Vermindertem räumliches Lernen und motorische Kontrolle.

2013 charakterisierten Han et al. die erste *Shank3* Überexpressionsmaus. Verglichen mit Wildtypmäusen wiesen diese transgenen Mäuse ca. 50% mehr Shank3 Protein auf und zeigten einen hyperkinetischen bzw. manischen Phänotyp. Repetitive Verhaltensweisen konnten nicht festgestellt werden, aber die erhöhte Anfälligkeit für Epilepsie deutete auf ein gestörtes Verhältnis von exzitatorischen zu inhibitorischen Synapsen zugunsten der exzitatorischen hin. Die Symptomatik besserte sich unter der Gabe von Valproat.

1.6 Ziel dieser Promotionsarbeit

Fehlfunktionen von *SHANK* werden mit einem vielseitigen Spektrum an Synaptopathien in Verbindung gebracht. Da *SHANK* assoziierte Erkrankungen eine große Variabilität der klinischen Symptomatik zeigen, aber allen ein ähnlicher Pathomechanismus zugrunde liegt und *SHANK* außerdem zahlreiche Interaktionspartner hat, die von Veränderungen mitbetroffen sind, ist diese Proteinfamilie ein vielversprechendes Ziel für die neuropsychiatrische Forschung und für eine mögliche, zukünftige Therapieentwicklung. Die *SHANK* Forschung wurde vor ca. 25 Jahren begonnen und lieferte bislang durch neurobiologische Untersuchungen in Zellkultur und Mausmodellen erste aufschlussreiche Ergebnisse. Dennoch gilt es die molekularen Auswirkungen der *SHANK* Mutationen noch genauer zu erforschen und zu verstehen, um einem effektiven Management von *SHANK* assoziierten Erkrankungen näher zu kommen.

Das Seaver Autism Center am New Yorker Mount Sinai Hospital veröffentlichte im Juni 2013 eine Studie mit 32 autistischen Patienten, die hinsichtlich ihrer Genetik und klinischen Symptomatik untersucht wurden [71]. Drei der Patienten wiesen neu aufgetretene Stopp-Mutationen im *SHANK3* Gen auf, die zum Untersuchungsgegenstand dieser Promotion wurden. Während die klinischen Daten der Patienten mit den Mutationen c.1527G>A und c.2497delG von Soorya et al. [71] bereits z.T. veröffentlicht wurden, ist der Patient mit der c.5008A>T Mutation nachträglich aufgenommen worden und wird erstmals im Rahmen dieser Promotion beschrieben. Das Ziel dieser Promotionsarbeit war es, molekulare Veränderungen, die durch diese Mutationen verursacht wurden, in hippocampalen Rattenneuronen nach Überexpression der gezielt veränderten *SHANK3a* Sequenzen zu untersuchen. Der Fokus lag auf der morphologisch-neuroanatomischen Analyse der Dendriten, der Spines und der Anzahl exzitatorischer- und inhibitorischer Synapsen. Die Ergebnisse dieser Promotion sollen einen Beitrag zum besseren Verständnis synaptopathischer Veränderungen leisten, um eine der vielen Ursachen von Autismus in Zukunft besser zu verstehen und möglicherweise auch besser behandeln zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborwerkzeuge und Maschinen

Absauger	ABM Greiffenberger Antriebstechnik, Marktredwitz
Absauger, Vacusafe comfort	Integra Bioscience, Fernwald
Brutschrank	HERA cell, Heraeus, Hanau
Deckgläschen, 13 mm Ø	VWR, Wien
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektroporationsküvetten	BioRad, München
Elektroporator	Eppendorf, Hamburg
Entwicklungsgerät MicroChemi 4.2	Bioimaging Systems, Israel
Eppendorfcups 0,2/0,5/1,5/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop	Imager. Z1 Zeiss, Oberkochen
Gefrierschrank -20°C	Liebherr Economy, Schweiz
Glasplatten	BioRad, München
Glasflaschen 100 ml, 500 ml, 1 L	Schott Duran, Mainz
Inkubator Certomat® R	Braun Biotec, Melsungen
Kühlschrank +4°C	Liebherr Economy, Schweiz
Magnetrührplatte	IKA – combimag RCT, Staufen
Mikroskop	Nikon eclipse TS 100, Tokio
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Thermo scientific, USA
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Nitrocellulosemembran, 0,45 µm	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Objektträger 24x60 mm	VWR, Wien
Petrischalen 100x20 mm (8cm Ø)	Cellstar® Greiner bio-one, Frickenhausen
pH meter ino Lab	WTW, Weilheim
Photometer	Labsystems Multiskan RC, USA
Pipetboy	Acu Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten 5, 10, 25 ml	Falcon® Becton Dickinson, USA
Pipetten P10, P20, P100, P200, P1000	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	IKA® KS 260 basic, Staufen
Sonicator Sonoplus UW 2070	Bandelin electronics, Berlin
Spannungsgerät	BioRad, München
Sterile Filter 0,2 µm Porendichte	Nalgene, Thermo Sciendific, USA
Sterile Werkbank	Nunc, Wiesbaden
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank -80°C	Forma Scientific, USA
Tischzentrifuge, Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Tubes, 15 und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
UV-Gerät	Hofer, Niederlande
Vortexer	Heidolph REAX top, Schwabach
Waage	Sartorius, USA
Wasserbad	Grant, München
Westernblotkammern	BioRad, München

Material und Methoden

Whatmann TM Filterpapier	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
X-ray Film	Amersham, UK
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Cellstar® Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten, 24 Wells	Falcon® Becton Dickinson, USA
Zellkulturplatten, 96 Wells	Cellstar® Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb 100 µm Nylon	BD Falcon TM, Becton Dickinson, USA
Zentrifuge, Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau

2.1.2 Chemische Substanzen

Die in dieser Arbeit verwendeten chemischen Substanzen stammten überwiegend von den Firmen AppliChem (Darmstadt), ICN-LabSolutions (Northeim), Calbiochem, Fluka, Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe).

Antibiotika:

Ampicillin 5 g in 50 ml deionisiertem Wasser lösen
→ Filtrieren (0,22 µm), 100 mg/ml Aliquots lagern bei -20°C

Kanamycin 2,5 g in 50 ml deionisiertem Wasser lösen
→ Filtrieren (0,22 µm), 50 mg/ml Aliquots lagern bei -20°C

2.1.3 Puffer

1x PBS

8g NaCl
0,2g KCl
1,44g Na₂HPO₄
0,24g KH₂PO₄
→ Mit 700 ml deionisiertem Wasser auffüllen und den pH-Wert messen, der bei 7,4 liegen sollte. Mit 1M HCl kann der pH-Wert korrigiert werden
→ Mit deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 L auffüllen

4x Ladepuffer für SDS Page (Lagerung bei +4°C)

6 ml Tris HCL, pH 6,8
0,93 g DTT
1,2 g SDS
0,24 ml EDTA 0,5 M
12 ml Glycerol 100%
0,02% Bromphenolblau

Material und Methoden

10x Laufpuffer

30,30 g Tris (25 mM)
144 g Glycin (192 mM)
10g SDS (0,1%)
→ Alles in 1 L deionisiertem Wasser lösen

1x Laufpuffer

100 ml 10x Laufpuffer
900 ml Deionisiertes Wasser

10x Blotpuffer

30,30 g Tris (25 mM)
144 g Glycine (192 mM)
→ Alles in 1 L deionisiertem Wasser lösen

1xBlotpuffer

100 ml 10x Blotpuffer
200 ml Methanol
700 ml Deionisiertes Wasser

10x TBS, pH 7,6

24,2 g Tris
80,0 g NaCl
→ 1 M HCl hinzugeben bis der pH-Wert bei 7,6 eingestellt ist
→ Mit deionisiertem Wasser auf 1 L Volumen auffüllen

0,2% TBS-Tween

900 ml Deionisiertes Wasser
100 ml 10x TBS
2 ml Tween

0,05% TBS-Tween

Ebenso
Ebenso
500 µl Tween

Lysispuffer, Lagerung bei +4°C

150 mM NaCl
1% Triton® X-100, Roche®, Basel
5 mM Tris HCL, pH 8,8

HBSS von der Firma Gibco®, life technologies, USA

2.1.4 Medien

LB – Medium

20 g LB Broth Base, invitrogen, Karlsruhe
1 L Deionisiertes Wasser
Für 20 Minuten bei 121°C autoklavieren

LG – Agar

32 g Lennox L Agar, invitrogen, Karlsruhe
1 L Deionisiertes Wasser
Für 20 Minuten bei 121°C autoklavieren

SOB – Medium

20 g Tryptone oder Peptone
5 g Yeast
0,5 g NaCl
1 L Deionisiertes Wasser
Unter Wärme rühren und 20 Minuten bei 121°C autoklavieren
500 µl auf 50 ml MgCl₂ 2 M zum Gebrauch frisch dazugeben
SOB

2yT – Medium

10 g Tryptone
10g Hefeextrakt
5g NaCl
→ Mit deionisiertem Wasser auf 1 L Volumen auffüllen
→ Für 20 Minuten bei 121°C autoklavieren

NB+++

1 ml B27 (gegen das Wachstum der Gliazellen), (Gibco®)
0,5 ml Glutamin (200 mM)
0,5 ml Penicillin, Streptomycin (10 000 E Pen., 10 000 µg/ml Strep.)
50 ml Neurobasal-Medium (Gibco®)

DMEM+++

10 ml FBS (Gibco®)
1 ml Glutamin (200 mM)
1 ml Penicillin, Streptomycin (10 000 E Pen., 10 000 µg Strep.)
100 ml DMEM-Medium (Gibco®)

HEK-Zell Medium

DMEM (Gibco®) + 10% FBS (Gibco®)

2.1.5 Stammlösungen

10% APS

1,0 g APS
10 ml Deionisiertes Wasser
→ Lagerung bei -20°C

30% Acrylamid/Bis Solution 29:1 Serva, Heidelberg

Temed BioRad, München

PLL Sigma-Aldrich, Taufkirchen,
5 mg verdünnt in 100 ml HBSS

Glycerin 99% Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Vecta Mount Vector Laboratories, USA

Bradfordreagenz

100 ml Phosphorsäure 85%ig
50 ml Ethanol 95 %ig
1 L Deionisiertes Wasser
100 mg Serva Blue
→ 4 Std. rühren lassen
→ Filtrieren
→ Lichtgeschützt bei 4°C max. 6 Monate haltbar

PFA-Fixierlösung

4,8 ml PFA
6,0 ml 2x PBS
1,2 ml H₂O
15 % Sucrose

Blockiermilch – Western Blot

1x TBS + 5% Milch

Blockierlösung – Immunzytochemische Färbung

10 g BSA in 400 ml 1xPBS lösen
 5 ml Pferdeserum
 500 µl Triton® X-100
 → Mit 1xPBS auf ein Gesamtvolumen von 500 ml auffüllen

PEI, Transfektionsreagenz – HEK293-Zellen

Polyethylenimine, linear, MW – 25000, 2 g, Polyscience, Inc, USA

50 mg davon in 50 ml Puffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,4) lösen. Leicht erwärmen, um den Lösevorgang zu verbessern. Steril filtrieren und bei -20°C lagern.

2.1.6 Western Blot Gele

Laufgel	Zwei 8%ige Gele	Zwei 12%ige Gele
H ₂ O	4,6 ml	3,3 ml
30% Acrylamidmix	2,7 ml	4,0 ml
1,5 M Tris HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,009 ml	0,009 ml

Ladegel	Für zwei Gele
H ₂ O	2,7 ml
30% Acrylamidmix	0,67 ml
1,5 M Tris HCl, pH 6,8	0,5 ml
10% SDS	0,04 ml
10 % APS	0,04 ml
TEMED	0,006 ml

2.1.7 Kits

Name	Nutzung	Firma
<i>Pierce ECL Western blotting substrate</i>	Visualisierung von Signalen im Western Blot	Pierce USA
<i>JetStar™ 2.0 Plasmid Purification Kit</i>	DNA-Vermehrung	Genomed, Löhne
Optifect™ Reagent	Eukaryote Zelltransfektion	Invitrogen, Karlsruhe
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent	Zellfraktionierung	Thermo scientific, USA

2.1.8 Marker

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas St. Leon-Rot

170, 130, 100/92, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 kDa

2.1.9 Biologisches Material

cDNA

Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte ließ das Buxbaum Laboratory, Mount Sinai Hospital New York, synthetisieren [22]. Humane, komplementäre *SHANK3a* DNA (cDNA), die auf der Sequenz NP_277052.1 basiert, wurde in Zusammenarbeit mit GeneArt® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) neu synthetisiert. Für einen optimalen Gehalt an GC Nukleotiden wurde ein Myc-Tag direkt nach dem Startcodon eingefügt. Das „Subcloning“ wurde mit Hilfe des In-Fusion HD Cloning System (Clontech, Mountain View, CA, USA) durchgeführt. Die gesamte *SHANK3a* cDNA wurde von Yuji Kajiwara (Department of Psychiatry, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York, NY 10029, USA) unter zu Hilfenahme folgender Primer vervielfältigt:

5'-GTCCGGACTCAGATCTATGGAGCAGAAGCTGATCAG-3' und 5'-GTCGACT GCAGAATTCTCAGCTGCCGTCCAGCTGT-3'. Anschließend wurde die Sequenz in den pAcGFP1-C1 (Clontech) Vektor an den Schnittstellen Bgl2 und EcoR1 eingefügt und durch Sangersequenzierung überprüft. Zur Synthese der c.1527G>A Variante wurde das Primerset 5'- GCTTCTGaGAGGGCACCGTG AAG-3' und 5'-TGCCCTCtCAGAAGCCGCCCTCG-3' verwendet. Nach der Deletion in der Variante c.2497delG wurde die Sequenz angefügt, die vom Deletionsort bis zum vorzeitigen Stopp-Codon reicht [22]. Für die Herstellung der c.5008A>T Variante wurden folgende Primer eingesetzt:

5'-GTGGTCCtAGTTCGACGTGGGCGACTGG-3' und 5'-CGAACTaGGACCACA GCTGCAGGGGTTT-3'. Das zur Kotransfektion der Neurone verwendete Konstrukt DenMark wurde 2010 von Nikolaï et al. beschrieben [61] und uns für die Experimente vom Hassan Laboratory der Universität Leuven zur Verfügung gestellt. Das in einigen Experimenten verwendete *Shank3* (*Rattus norvegicus*) Konstrukt wurde bereits von Grabrucker et al. 2013 beschrieben [33, 35].

Primärantikörper

<i>Name des Antikörpers</i>	<i>Firma</i>	<i>Verdünnung</i>
Anti-GFP ms	Clontech, USA	1:20 000
Anti-Myc ms	Roche®, Basel	1:2000
Anti-ProSAP2 Pro-rich rb	Schmeisser et al., 2012	1:30 000
Anti-VGluT1 gp	Synaptic Systems, Göttingen	1:600
Anti-VGaT rb	Synaptic Systems, Göttingen	1:400

Sekundärantikörper

<i>Name des Antikörpers</i>	<i>Firma</i>	<i>Verdünnung</i>
Anti-ms IgG, HRP-conjugated	DakoCytomation, Denmark	1:10 000
Anti-rb IgG, HRP-conjugated	DakoCytomation, Denmark	1:1000
Anti-rb IgG, Alexa-Fluor 647	Invitrogen, Karlsruhe	1:750
Anti-gp IgG, Alexa Fluor 647	Invitrogen, Karlsruhe	1:750
Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe	1:20
Dapi	Roche®, Basel	1:50 000

Enzyme

Der in dieser Arbeit verwendete Proteaseinhibitor *Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets* von Roche®, Basel, wurde in 1 ml zu einem 50-fachen Stock aufgelöst und bei -20°C gelagert.

Organismen

Bakterien	E.coli XL1 K12 DH5α
Zelllinien	COS-7 HEK293T

Versuchstiere

Es wurden trächtige Sprague Dawley Rattenweibchen getötet, um ihnen Embryonen an E18 für die Hippocampuspräparation und für das Anlegen primärer hippocampaler Neuronenkulturen zu entnehmen.

2.2 Methoden:

2.2.1 Kultivierung und Lagerung von E.coli Bakterien

Um E.coli zu kultivieren, wurde LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Bei Plasmid tragenden Bakterien musste entsprechend der Antibiotikumsresistenz des Plasmids ein Antibiotikumszusatz von 1:1000 erfolgen. Eine dauerhafte Aufbewahrung war bei -80°C in Form eines Glycerolstocks gewährleistet. Um diesen herzustellen, wurde 1 ml der Bakterienkultur in 1 ml steriles, 50%iges Glycerol gegeben und zügig bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Herstellung elektrokompenter E.coli

Die in dieser Arbeit verwendeten DH5 α und E.coli XL1 K12 Stämme wurden in 50 ml 2yT- Medium in einer Übernachtkultur vermehrt. Die Inkubation fand auf dem Schüttler bei 37°C und 200 rpm statt. Die OD₆₀₀ betrug am nächsten Tag etwa 1.

Nach und nach wurden Anteile der Übernachtkultur in frisches 2yT-Medium gegeben, bis eine Verdünnung von etwa 0,3 OD₆₀₀ erreicht war. In einem Zeitraum von ca. zweieinhalb Stunden ließ man die Bakterien auf einen Wert von 0,9 OD₆₀₀ heranwachsen und zentrifugierte den Ansatz anschließend für zehn Minuten bei 4000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in deionisiertem Wasser resuspendiert. Es wurde für zehn Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in deionisiertem Wasser resuspendiert. Insgesamt wurde dreimal bei 3000 rpm zentrifugiert und anschließend resuspendiert. Im Verlauf wurde der Inhalt von mehreren 50 ml Tubes in einem Tube gepoolt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Wasser abpipettiert und das Pellet in einer äquivalenten Menge deionisiertem Wasser mit 10% Glycerol resuspendiert.

Das Aliquotieren in 50 μ l Aliquots fand zügig auf einer tiefgefrorenen Platte statt. Die elektrokompenten Bakterien wurden bei -80°C gelagert.

2.2.3 Transformation von Bakterien/ Elektroporation

Zur Vorbereitung standen SOB - Mg²⁺,Ca²⁺ - Medium, Elektroporationsküvetten, das DNA-Konstrukt und die zu transformierenden Bakterien auf Eis bereit.

0,3-0,5 µl des DNA-Konstruktes wurden in ein 50 µl Bakterienaliquot gegeben und alles zusammen anschließend tief in die Küvette gefüllt. Nach Platzierung der Küvette im Gerät, fand die Elektroporation bei 1800 Volt statt.

Aus der Küvette wurden die transformierten Bakterien mit 1 ml SOB - Mg²⁺, Ca²⁺ - Medium aufgenommen und in ein vorbereitetes Eppi gefüllt. Die transformierten Bakterien wurden für 60 Min bei 37°C auf dem Schüttler vermehrt.

Nach diesem Vermehrungsschritt wurde für zwei bis drei Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit 100 µl SOB - Mg²⁺,Ca²⁺- Medium resuspendiert. Auf einer LB-Agarplatte mit einem Antibiotikumszusatz, der identisch mit der Resistenz des Konstruktes war, wurde ein Dreiösenausstrich durchgeführt und die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag sollten Kolonien gewachsen sein. Zwei Einzelkolonien wurden in 2 ml LB-Medium mit Antibiotikumszusatz (Verdünnung 1:1000) über Nacht vermehrt. Am darauffolgenden Tag wurden die gewachsenen Bakterien mit einer äquivalenten Menge 87%igem Glycerins versehen und bei -80°C tiefgefroren.

Zur Kontrolle der Kompetenz der Bakterien, wurden sie mit einem Puc-Konstrukt transformiert.

Jeder Glycerolstock wurde nach den S1-Sicherheitsvorschriften dokumentiert.

2.2.4 DNA-Vermehrung

Die DNA-Vermehrung wurde mithilfe des JetStar Plasmid Purification Kits von Genomed durchgeführt. Dabei wurde nach den Angaben für die Midi-Prep gearbeitet. Die Inhalte des Kits setzten sich zusammen aus:

<u>Puffer</u>	<u>Inhalt</u>
Zellresuspensionspuffer (E1)	50 mM Tris-HCL, pH 8.0 10 mM EDTA
RNAse A	20 mg/mL in 50 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA, pH 8.0
Lysispuffer (E2)	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS

Material und Methoden

Präzipitationspuffer (E3)	3,1 M Kaliumacetat, pH 5,5
Äquilibrationspuffer (E4)	0,1 M Natriumacetat, pH 5,0 0,6 M NaCl 0,15% (v/v) Triton X-100
Waschpuffer (E5)	0,1 M Natriumacetat, pH 5.0 0,8 M NaCl
Elutionspuffer (E6)	0.1 M Tris-HCl, pH 8.5 1,25 M NaCl

In einer Übernachtkultur wurden E.coli in 50 ml LB-Medium mit 1:1000 Antibiotikazugabe bei 37°C und 200 rpm vermehrt. Für zwei Konstrukte war zuvor eine Vorkultur angelegt worden.

Vor Beginn der Plasmidextraktion wurden die im Kit verwendeten Säulen mit dem Puffer E4 äquilibriert. Nach zehnmütigem Zentrifugieren der Übernachtkultur bei 4500 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml Zellresuspensionspuffer (E1) resuspendiert. Beim ersten Gebrauch des Kits wurde der Puffer E1 mit RNase versehen.

Die Zelllyse wurde durch Zugabe von 4 ml Lysispuffer (E2) ausgelöst. Nach vorsichtigem Invertieren des Tubes und fünfminütiger Inkubation wurden 4 ml Präzipitationspuffer (E3) hinzugefügt und der Tube sofort invertiert, bis die Lösung homogen erschien. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4500 rpm über 30 Minuten.

Anschließend wurde über die Säulen mehrschichtig Mull gelegt und der Überstand der letzten Zentrifugation durch die Mullbarriere auf die Säulen gegeben. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA bindet diese an die positiv geladenen Anionenaustauscher im Inneren der Säule, während RNA, Kohlenhydrate und Proteine durch die folgenden zwei Waschschrte mit jeweils 10 ml Waschpuffer (E5) aus der Säule herausgespült wurden. Nach dem Waschen der Säulen wurden sie in sterile Tubes gestellt und die DNA mit 5 ml des Puffers E6 eluiert. Die hohe Salzkonzentration des Puffers führt zur Ablösung der gebundenen DNA-Moleküle. Um die Plasmide von den Salzen der Puffer zu reinigen, wurden sie in 3,5 ml Isopropanol 60 Minuten bei 4500 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes wurde vor dem letzten

Zentrifugationsschritt 3 ml 70% Ethanol dazugegeben und für 30 Minuten bei 4500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA für zehn Minuten luftgetrocknet und in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

Die Messung der DNA-Konzentration wurde am NanoDrop (Thermo scientific) durchgeführt. Das Prinzip der Messung beruht auf ultravioletter Spektralphotometrie. Optimale DNA-Konzentrationen lagen zwischen 1 und 2 µg/µl.

2.2.5 Permanente und temporäre Lagerung von HEK293T-Zellen

Die dauerhafte Lagerung der in dieser Arbeit verwendeten HEK-Zellen erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Solange die Zellen regelmäßig passagiert wurden, lagerten sie bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.6 Kultivierung von HEK293T-Zellen

Nachdem die tiefgefrorenen HEK-Zellen aufgetaut und auf 37°C angewärmt waren, wurden sie in 5 ml DMEM+10% FBS suspendiert und bei 600 x g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml 37°C warmem DMEM + 10% FBS resuspendiert und auf 25 cm² große Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.7 Passagieren von HEK293T-Zellen

Bevor mit dem Passagieren der HEK-Zellen begonnen werden konnte, mussten alle verwendeten Medien und Puffer auf 37°C angewärmt werden. Das Altmedium wurde vollständig entfernt und die Zellen mit 3 ml 1xPBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml 0,125%iges Trypsin + Versen auf die Zellen gegeben und für zwei Minuten bei 37°C inkubiert. Um die HEK-Zellen vom Flaschenboden zu lösen, musste die Flasche geschüttelt werden. Die Resuspension der gelösten Zellen erfolgte zum weiteren Passagieren in 9 ml DMEM+10% FBS und für das Anlegen von Transfektionsschalen (7,5 cm²) in 4 ml DMEM+10% FBS.

Zum Passagieren wurde ein 1:10 Splitfaktor aus der ursprünglichen Zellschale (25 cm²) hergestellt, indem 1 ml der Zellsuspension in 9 ml frisches DMEM+10% FBS verdünnt und wieder in eine 25 cm² Flasche gegeben wurde.

Um Transfektionen durchzuführen wurde mit einer geringeren Zelldichte gearbeitet und ein Splitfaktor von 1:15 erzielt. In 9 ml frisches Medium wurde 1 ml aus der

oben beschriebenen 4 ml Zellsuspension genommen die zwar höher konzentriert war als die ursprüngliche Zellflasche, aber auf 5x 7,5 cm² verteilt wurde. Auch um 24-Well-Platten anzulegen, wurde mit einem Splitfaktor von 1:15 gearbeitet.

Um passagierte HEK-Zellen wieder in eine permanente Lagerung zu überführen, wurden die trypsinierten Zellen in 5 ml DMEM+10% FBS resuspendiert und bei 600 x g für fünf Minuten bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml FBS und 0,2 ml DMSO resuspendiert und schrittweise auf -70°C heruntergekühlt. Die endgültige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

2.2.8 Transfektion von HEK293T-Zellen

Eine 7,5 cm²-Petrischale mit etwa 3 Mio. Zellen wurde mit 4 µg DNA transfiziert. Im Vorfeld wurden 240 µl DMEM (Gibco®), die entsprechende DNA-Menge und 25 µl PEI in einen Eppendorfcup pipettiert. Nach zehninütiger Inkubation bei RT wurde 1 ml DMEM+10% FBS hinzugegeben und alles zusammen an den Rand einer HEK-Zellschale pipettiert. Bis zur weiteren Verarbeitung bzw. Fixierung blieben die transfizierten HEK-Zellen für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die Transfektion der 24-Well-Platten wurde mit 1 µg DNA pro Well durchgeführt.

2.2.9 Fixierung von HEK293T-Zellen

Nach zweimaligem Waschen mit PBS (+Mg²⁺ und Ca²⁺) wurde für zehn Minuten 300-400 µl PFA auf die Wells gegeben. Danach folgten wieder zwei Waschschrte mit PBS, wobei das PBS jeweils fünf Minuten auf den Wells gelassen wurde. Bis zur Färbung, die innerhalb einer Woche erfolgte, lagerten die fixierten HEK-Zellen bei +4°C.

2.2.10 Färbung von HEK293T-Zellen

Nach Überführung der Deckgläschen aus der 24-Well-Platte in eine Färbekammer wurde im ersten Schritt jedes Deckgläschen mit 100 µl PBS gewaschen. Phalloidin 647 wurde im Verhältnis 1:20 in PBS verdünnt und für 40 Minuten bei RT einwirken gelassen. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen, bevor DAPI (1:50 000) für fünf Minuten auf die Deckgläschen gegeben wurde. Nach zwei letzten Waschschrten, einmal mit PBS, einmal mit deionisiertem Wasser, wurden

die Deckgläschen mit VectaMount auf den Objektträgern fixiert. Innerhalb der folgenden zehn Tage erfolgte die mikroskopische Auswertung.

2.2.11 Mikroskopie

Die mikroskopische Auswertung sowohl transfizierter und gefärbter HEK-Zellen als auch transfizierter und gefärbter Neurone erfolgte an einem Imager. Z1 Fluoreszenzmikroskop von Zeiss und der dazugehörigen Software AxioVision SE64 Rel. 4.8.

2.2.12 HEK293T-Zelllysat

Aus den transfizierten HEK-Zellen ließen sich Lysate für die Western Blot-Analyse herstellen. Dazu wurden die HEK-Zellschalen 48 Stunden nach der Transfektion in PBS zweimal gewaschen und anschließend mit 200 µl Lysispuffer der vorher mit 4 µl Proteaseinhibitor (50-facher Stock) versehen worden war, vom Schalenboden abgeschabt. Über sechs Stunden wurde das Lysat bei +4°C im Überkopfschüttler inkubiert, kurz herunterzentrifugiert und nach Überstand und Pellet getrennt abgefüllt. Das Pellet hatte eine zähe Konsistenz und wurde zehn Sekunden lang mit neun Ultraschallzyklen beschallt, was es einfacher zu pipettieren machte. Bevor die Zelllysate bei -80°C eingefroren wurden, musste die Proteinkonzentration im Photometer bestimmt werden.

2.2.13 Herstellung von Zellfraktionen

Transfizierte HEK-Zellen dienen außerdem der Zellfraktionierung. Die Herstellung einer zytosolischen und einer nukleären Fraktion wurde mit Hilfe des *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* von Thermo scientific durchgeführt.

Inhalt:

Cytoplasmic Extraction Reagent 1 (CER1)

Cytoplasmic Extraction Reagent 2 (CER2)

Nuclear Extraction Reagent (NER)

Auf 7,5 cm² Zellschalen wurden 300 µl Trypsin-EDTA gegeben. Die sich lösenden HEK-Zellen wurden abgeschabt und bei 500 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300 µl PBS resuspendiert. Aus der Suspension wurden 20 µl in ein 1,5 ml Eppi gefüllt und wieder bei 500 x g für drei Minuten zentrifugiert.

Vorsichtig wurde der Überstand entfernt und auf das möglichst trockene Pellet 200 µl eiskaltes CER 1 gegeben. Vortexen für fünfzehn Sekunden auf höchster Stufe vermischte die Zellen mit dem Reagenz. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten auf Eis wurden 11 µl von CER 2 hinzugegeben und für fünf Sekunden auf höchster Stufe gevortext. Nach einer Minute auf Eis und abermaligem Vortexen für fünf Sekunden folgte ein Zentrifugationsschritt für acht Minuten bei 16 000 x g. Gleich im Anschluss musste der Überstand, der die zytosolische Fraktion enthielt, in ein vorgekühltes Eppi abpipettiert werden, das bei -80°C eingefroren wurde. Das möglichst trockene Pellet, wurde mit 100 µl eiskaltem NER versetzt und für fünfzehn Sekunden gevortext. Über einen Zeitraum von 40 Minuten wurde alle zehn Minuten fünfzehn Sekunden lang gevortext, während die Proben in der Zwischenzeit auf Eis inkubieren konnten. Nach vierzehnminütigem Zentrifugieren bei 16 000 x g trennte sich die nukleäre Fraktion als Überstand ab und konnte in vorgekühlte Eppies umgefüllt werden. Auch hier erfolgte die Lagerung bei -80°C.

2.2.14 Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit der Bradford-Methode photometrisch gemessen. Für eine Dreifachbestimmung waren jeweils 20 µl NaCl (150 mM), 2 µl Probe und 200 µl Bradfordreagenz zusammenzupipettieren. Nach einer lichtgeschützten Inkubationszeit von zehn Minuten konnte die Messung durchgeführt werden. Die Messwerte wurden anschließend mit der für diese Bradfordreagenz erstellten BSA-Eichkurve verrechnet.

Nach Anwendung des NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent Kits wurde die Proteinbestimmung direkt am Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo scientific, USA) durchgeführt. Zur Leerwertmessung wurden die im Kit benutzten Puffer verwendet.

2.2.15 Western Blot Analyse

Abhängig von den gemessenen Proteinkonzentrationen wurden die Proben mit ultra reinem Wasser von Millipore versehen, um Konzentrationsunterschiede auszugleichen. Jede Probe wurde mit 4xSDS Puffer im Verhältnis 1:4 versehen und alles zusammen fünf Minuten lang bei 95°C erhitzt. Nach anschließender Zentrifugation war die Vorbereitung der Proben abgeschlossen und sie konnten in 8%ige bzw. 12%ige Gele geladen werden. Das Ladevolumen pro Tasche betrug in

den meisten Versuchen 10 µl. Die Laufkammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt und zu Beginn bei 120 Volt an das Spannungsgerät angeschlossen. Die Spannung konnte nach etwa zehn Minuten auf 210 V erhöht werden. Die Größe und Laufhöhe der Proteine konnte anhand des Markers Page Ruler Prestained Protein Ladder abgeschätzt werden.

Die während der Elektrophorese nach Größe separierten Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurden Schwämme, Whatman-Papier und die Nitrozellulosemembran in Blotpuffer getränkt, das Gel auf die Membran transferiert, sowohl ober- als auch unterhalb der Membran das Whatman-Papier und die Schwämme plaziert und in dieser Zusammenstellung über eine Halterung in der Blotkammer fixiert. Die Blotkammer enthielt neben dieser Halterung einen Eisblock und einen Magnetrührer und wurde komplett mit Blotpuffer aufgefüllt. Unter kontinuierlicher Bewegung des Blotpuffers durch einen rotierenden Magnetstab fand der Blotvorgang 100 Minuten lang bei 90 Volt statt.

Die proteinbeladene Membran musste im Folgenden zwei Stunden lang bei RT unter Bewegung auf dem Schüttler in Blockiermilch bewegt werden, um unspezifische Bindungsstellen für den Erstantikörper zu besetzen. Der Erstantikörper wurde im Anschluss in der jeweils optimalen Konzentration in 0,05% TBST verdünnt und unter permanenter Bewegung über Nacht bei 4°C auf die Membran gegeben.

Nach dreimaligem Waschen mit 0,2% TBST im Abstand von zehn Minuten am nächsten Tag konnte der Zweitantikörper, ebenfalls in 0,05% TBST verdünnt, auf die Membran gegeben werden. Der Zweitantikörper blieb bei RT für eine Stunde auf der Membran und im Anschluss folgten wieder drei jeweils zehnminütige Waschschriffe über einen Zeitraum von insgesamt 30 Minuten. Alle Schritte erfolgten unter kontinuierlicher Bewegung auf dem Schüttler (100 rpm).

Die Darstellung der Western Blot Signale erfolgte entweder über die Entwicklung von X-ray Filmen in der Dunkelkammer oder digital mithilfe des Entwicklungsgeräts MicroChemi 4.2. In beiden Fällen wurde als Photolösung Pierce ECL *Western blotting substrate* verwendet. Die Dauer der Belichtungszeit variierte in Abhängigkeit von der Signalstärke.

2.2.16 Hippocampuspräparation in der Ratte

Diese Arbeit basiert überwiegend auf Ergebnissen die aus der Analyse hippocampaler Neuronenkulturen entstanden. Um eine primäre Zellkultur anzulegen, mussten Spenderorganismen, in diesem Fall Sprague Dawley Ratten, getötet werden.

Die eigentlichen Spenderorganismen waren achtzehn Tage alte Rattenembryonen (E18), die nur durch die Tötung der schwangeren Mutter zur Präparation zur Verfügung standen. Nach Eröffnung des Bauchraumes der Mutter konnten die Embryonen entnommen und dekapitiert werden. Das Präparationsmaterial lag von diesem Schritt an in eiskaltem HBSS. Anschließend wurde aus den Köpfen der Embryone das Gehirn als Ganzes herauspräpariert, um im nächsten Schritt unter dem Binokular die beiden Hippocampi zu entnehmen. Diese wurden in 10 ml rotem HBSS auf Eis bis zum Ende der Präparation gelagert.

Alle folgenden Schritte fanden unter der sterilen Werkbank statt.

2.2.17 Anlegen der hippocampalen Zellkultur

Das HBSS, in dem die Hippocampi während der Präparation aufbewahrt wurden, wurde abpipettiert und durch 10 ml frisches HBSS ersetzt. Dieser Waschschrift wurde viermal durchgeführt und jedes Mal darauf geachtet, dass die aufgewirbelten Hippocampi sich ganz am Boden abgesetzt hatten, ehe das HBSS abpipettiert wurde. Nach dem letzten Waschschrift blieben 1,8 ml HBSS mit den gesammelten Hippocampi am Boden des Tubes. Es wurden 200 µl 2,5% Trypsin hinzugegeben und entsprechend der Anzahl der präparierten Embryone „eine Minute pro Embryo“ bei 37°C inkubiert. Anschließend musste sofort sehr sorgfältig das trypsinhaltige HBSS abpipettiert werden. Es folgten drei vorsichtige Waschschrift mit je 3 ml DMEM, das mit 10% FBS versetzt war.

Nach dem letzten Waschen blieben 1,6 ml DMEM+FBS mit den klumpigen Hippocampi im Tube, zu den 10 µl 0,05% DNase gegeben wurde. Nach einer kurzen Inkubation von drei Minuten wurde der lockere Verband der Hippocampi durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren versucht aufzulösen, um eine homogene Verteilung in der Flüssigkeit zu erzielen. Diese wurde über ein Filterpapier in ein neues Tube gegeben. 20 ml 37°C warmes DMEM+++ wurden ebenfalls durch den

Filter gegeben, um möglichst viel Material hindurch zu spülen. Nach mehrmaligem Invertieren konnten diesem Tube 10 µl des Inhalts entnommen werden, um die darin enthaltenen Neurone unter dem Mikroskop in der Zählkammer zu bewerten und auszuzählen.

Bereits vor der Präparation waren 24-Well-Platten vorbereitet worden. D.h. in jedes Well war ein Deckgläschen gelegt worden und jedes Deckgläschen wiederum mit 500 µl PLL für mind. 90 Minuten beschichtet worden. Nach der Beschichtung folgten drei Waschschrte mit autoklaviertem, deionisiertem Wasser.

In dieser Arbeit wurden in allen Experimenten 30 000 Zellen pro Well ausplattiert. Nach zwei bis drei Stunden wurde ein Mediumwechsel mit 37°C warmen NB+++ Medium durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5%.

2.2.18 Transfektion der Neurone

An Tag elf in vitro wurden die Transfektionen durchgeführt. Im ersten Schritt wurde 1 µg des DNA-Konstruktes in 50 µl NB-Medium pipettiert. In einem anderen Tube wurden in 50 µl NB-Medium 5 µl der Transfektionsreagenz Optifect gegeben und das Gemisch für fünf Minuten bei RT inkubiert. Optifect ermöglichte eine chemische Transfektion über Bildung von Liposomen um die DNA-Moleküle, die daraufhin von der lipophilen Zellmembran aufgenommen werden konnten. Alle bisherigen Angaben bezogen sich auf die Menge für ein Well. Anschließend wurde das in NB-Medium verdünnte Optifect zur DNA gegeben und für 30 Minuten bei RT inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde ein Mediumwechsel bei den zu transfizierenden Neuronen durchgeführt. Im Vorfeld war NB-Medium mit den Zusätzen Glutamin (1%) und B27 (2%, zur Hemmung des Gliawachstums) versetzt worden. Bevor NB++ auf die Neurone gegeben wurde, musste ein zweimaliger Waschschrte mit NB-Medium ohne Zusätze erfolgen. Das Altmedium wurde aufbewahrt.

Nach der 30-minütigen Inkubation konnten pro Well 95-100 µl aus dem vorbereitetem DNA-Optifect-NB Mix auf die Neurone gegeben werden. Nach

leichtem, „achtförmigem Kreisen“ der 24-Well-Platten wurden sie zurück in den Brutschrank gestellt.

Sieben bis zehn Stunden später wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und den Neuronen das Altmedium zurückgegeben, in dem sie bis zur Transfektion kultiviert waren. Die Transfektionsdauer bis zur Fixierung der Neurone betrug insgesamt 72 Stunden. Für alle Experimente wurden Kotransfektionen mit 750 ng *SHANK3* Konstrukt und 750 ng DenMark als Füllkonstrukt durchgeführt.

2.2.19 Fixierung der Neurone

Um die Neurone von Mediumresten zu säubern, musste vor der eigentlichen Fixierung ein dreimaliger Waschschrift mit PBS + Mg²⁺ + Ca²⁺ erfolgen. Erst danach wurden 300 µl Paraformaldehyd in die Wells gegeben, die anschließend lichtgeschützt und bei RT eine fünfzehnminütige Inkubationszeit hatten.

Nach Entnahme des PFAs folgten wieder zwei Waschschriffe mit PBS. Die Lagerung der fixierten Neurone erfolgte bei 4°C. Spätestens nach sieben Tagen wurden sie immunzytochemisch gefärbt.

2.2.20 Immunzytochemische Färbung der Neurone

Nach der Überführung der Deckgläschen aus den 24-Well-Platten in eine Färbekammer und einem Waschschrift mit PBS wurden auf jedes Deckgläschen 100 µl Blockierlösung gegeben und unbewegt bei RT für 60 Minuten stehen gelassen. Zehn Minuten vor Ende dieser Inkubationszeit konnte der Erstantikörper in Blockierlösung verdünnt werden. Der Erstantikörper blieb über Nacht bei 4°C auf den Deckgläschen. Am nächsten Tag musste zweimal mit PBS gewaschen werden, ehe der Zweitantikörper, ebenfalls in Blockierlösung verdünnt, auf die Neurone gegeben werden konnte. Nach einstündiger Inkubationszeit des Zweitantikörpers bei RT und einem Waschschrift mit PBS konnte die Kernfärbung DAPI für sechs Minuten einwirken. DAPI wurde im Verhältnis 1:50 000 in PBS verdünnt.

Nach zwei abschließenden Waschschriften mit PBS konnten die Deckgläschen auf die Objektträger übertragen werden. VectaMount diente zur Befestigung der Deckgläschen auf den Objektträgern. Bis zur mikroskopischen Auswertung, die im Schnitt innerhalb von drei Wochen erfolgte, lagerten die Objektträger

lichtgeschützt bei +4°C. Die Mikroskopie erfolgte an demselben Gerät wie unter 2.2.11 beschrieben.

2.3 Computerprogramme

Neben Microsoft Excel, PowerPoint und Word wurden folgende Softwares verwendet: AxioVision SE64 Rel. 4.8, Graph Prism 5, ImageJ, LabSystems Multiskan RC Software, Nanodrop 2000/2000c Software.

2.4 Auswertung

In biologischen Modellen ist, trotz größter Bemühungen eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, eine gewisse Variabilität vorhanden, die auch in dieser Arbeit nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnte. Im Lauf der Arbeit wurde auf eine möglichst gleiche Qualität der Kulturen geachtet, aber dennoch konnten leichte Unterschiede in der Dichte und Vitalität der Neurone nicht vermieden werden.

Western Blots und Lokalisationsstudien:

Die Western Blots und Lokalisationsstudien in primären Hippocampusneuronen wurden rein qualitativ interpretiert.

Sholl-Analyse:

Für die Sholl-Analyse wurden Neurone im Fluoreszenzkanal des „Füllkonstruktes“ DenMark (568 nm) mit dem 20x-Objektiv aufgenommen. Diese Bilder wurden in ImageJ invertiert und im Farbkontrast verstärkt. In PowerPoint wurden zehn konzentrische Kreise mit den Radien 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 und 150 µm erstellt und das Neuron mit dem Zellkörper im Zentrum des kleinsten Kreises platziert. Die Auswertung bestand darin, die Kreuzungen der Dendriten mit den Kreisen für jeden Radius einzeln zu zählen. Diese Methode diente der Quantifizierung der Komplexität des Dendritenbaumes. Es ließ sich der Verzweigungsgrad und indirekt die Länge der Dendriten ermitteln.

Primärdendritenanzahl/-länge und Zellkernumfang:

Die Messung der Primärdendritenanzahl/-länge und des Zellkernumfangs erfolgte an Neuronen im DenMark Kanal, die mit dem 40x-Objektiv aufgenommen wurden. Gemessen wurde direkt im Programm AxioVision, das auch die Software für das hier verwendete Zeiss-Fluoreszenzmikroskop darstellte. In diesem Programm gab es Längen-, Flächen- und Konturmessfunktionen. Die Einheit, in der gemessen wurde, waren Mikrometer. Die Länge der Primärdendriten wurde definiert als die Strecke zwischen dem Ansatz am Zellkörper bis zur ersten Aufteilung in Sekundärdendriten.

Spinemorphologie:

Die Auswertung der Spinemorphologie erfolgte im Programm ImageJ an Aufnahmen im DenMark Kanal mit dem 40x-Objektiv. Dazu wurde am jeweiligen Dendrit ein Bereich von ca. 30 μm abgemessen, innerhalb dessen die Anzahl an Spines und Filopodien getrennt gezählt wurde. Nach einer genauen Vorabbetrachtung der hier verwendeten Neurone wurde definiert, dass dünne Fortsätze, die eine Länge von 1 μm überschritten, den Filopodien angehören und kürzere Fortsätze, die „Köpfchen“ und „Hälse“ aufwiesen, als Spines gewertet wurden. Darüber hinaus wurde die Länge der Filopodien von ihrer Basis am Dendriten bis zur Spitze vermessen.

Neben den *SHANK3* Konstrukten wurden die Neurone mit dem DenMark Konstrukt kotransfiziert, um den Dendritenbaum inklusive aller Fortsätze farblich zu markieren. Es ist nicht geklärt, ob DenMark in jedem transfizierten Neuron in gleichen Mengen exprimiert wurde und was Unterschiede in der DenMark-Proteinmenge bewirken. Es ist möglich, dass einige Neurone schwächer angefärbt waren als andere und damit die Spines dieser Neurone schlechter sichtbar waren. Bei der Auswahl der transfizierten Neurone wurde darauf geachtet, dass nur Neurone gewählt wurden, die eine ähnlich intensive Fluoreszenz aufwiesen, um möglichst gleiche Auswertungsbedingungen zu schaffen.

Synapsen-Auswertung:

Das VGluT1- sowie das VGAT-Signal wurde an Neuronen ausgewertet, die mit dem 40x-Objektiv aufgenommen wurden. Das jeweilige Neuron wurde für die

Auswertung der VGluT1- und VGAT-Signale in AxioVision in den Fluoreszenzkanälen für das DenMark Konstrukt und der immunzytologischen (647 nm) Färbung geöffnet. Im DenMark Kanal wurden Primär- und Sekundärdendriten ausgewählt, die nicht von anderen Dendriten überlagert waren. Die Primärdendriten wurden in ihrer ganzen Länge vermessen, die Sekundärdendriten variierten in ihren Ausschnitten zwischen 10 und 80 μm (Mittelwert ca. 45-50 μm). Anschließend wurde der Fluoreszenzkanal, in dem sich die Färbung VGluT1 oder VGAT darstellte, zusätzlich wieder geöffnet und alle Antikörpersignale in dem abgemessenen Dendritenbereich gezählt, die genau auf oder im Fall der VGluT1-Färbung in einem Abstand von maximal 1 μm von den mit DenMark gefüllten Dendriten zu sehen waren. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Quotienten „Anzahl der Antikörpersignalepunkte/ μm Dendrit“.

Die Messung der Fluoreszenzlevel von VGluT1 erfolgte am Computer mithilfe des Programms ImageJ. Es konnten Schwellenwerte für die Messung der Signalintensität eingestellt werden, sodass nur Punkte ab einer gewissen Intensität in die Auswertung miteinbezogen und keine Hintergrundsignale gewertet wurden. Das Programm maß die antikörperpositiven Punkte, behielt die genaue Lokalisation der Punkte bei und konnte anschließend an diesen Stellen das DenMark Signal messen. In Excel ließen sich die Werte, die auf DenMark positiven Stellen gemessen wurden von den Werten, die aus Bereichen ohne DenMark Signal stammten trennen. D.h. um die Signale zu erhalten, die von dem transfizierten Neuron stammten, wurden nur DenMark positive Werte in die Auswertung miteinbezogen. Das Programm lieferte einem sowohl Werte für die Fluoreszenzintensität als auch für die Anzahl aller messbaren Signale.

Es wurden zur Darstellung der Fluoreszenzintensität von VGluT1 Verhältnisse (Ratios) der drei untersuchten Chargen gebildet und jeweils auf die Kontrolle normiert, da die Belichtungszeiten der fotografierten Neurone nur innerhalb einer Charge gleich waren und für jede Charge individuell und bestmöglich gewählt wurden.

2.4.1 Statistische Auswertung

Die Western Blots und Lokalisationsstudien dienten einer rein qualitativen Analyse und wurden aus zwei unterschiedlichen Passagen und Transfektionen von HEK-Zellen durchgeführt.

Bei allen Experimenten in primärer Neuronenkultur wurde hingegen mit Zellmaterial aus drei voneinander unabhängigen Hippocampuspräparationen gearbeitet.

Pro Präparation wurden fünf bis acht (ganz überwiegend sieben) Neurone ausgewertet. Bei A5008T wurden anfänglich auch zwei Präparationen mit bis zu 11 Zellen ausgewertet.

In der Sholl-Analyse wurden pro Konstrukt alle 21 ausgewerteten Neurone (3 Präparationen, pro Präparation 7 Neurone) für den jeweiligen Radius zusammengefasst und dargestellt (n=21 für jeden Radius eines jeden Konstruktes).

Für die Messung der Primärdendritenlänge wurden alle Primärdendriten des Neurons vermessen. Es wurde der Mittelwert aller Längen eines Neurons berechnet, sodass letztlich ein Wert pro Neuron in die Darstellung einging (3 Präparationen, pro Präparation 2x7 und 1x8 Neurone, n=22).

Für die Auswertung der Spinemorphologie wurden aus jeder der drei Präparationen an jeweils fünf Neuronen zwei Sekundärdendriten ausgewertet. In die Darstellung ging der Mittelwert beider Sekundärdendriten eines Neurons ein (3 Präparationen, pro Präparation 5 Neurone, n=15).

Die VGluT1- und das VGAT-Signal wurden jeweils an vier Primär- und vier Sekundärdendriten ausgezählt. Es wurde jeweils der Mittelwert errechnet, sodass es pro Neuron einen Wert für Primär- und einen Wert für Sekundärdendriten gab. Da insgesamt 20-22 Neurone ausgewertet wurden, ergab sich daraus jeweils n=20-22.

Die Erstellung der Diagramme, sowie die Berechnung des Standard Errors of the Mean erfolgte in GraphPad Prism.

Material und Methoden

Um die Daten auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Konstrukten zu testen, wurde für die Sholl-Analyse ein one-way ANOVA - Bonferroni Test durchgeführt. Bei normal verteilten Werten bei der Spine- und Synapsenanalyse wurde ein one-way ANOVA und als Post Test ein Bonferroni Test durchgeführt. Bei nicht normal verteilten Werten wurde der empfohlene Kruskal-Wallis Test (mit dem Dunn's Multiple Comparison Test als Post Test) durchgeführt. Für alle anderen Diagramme wurde nach der Testung auf Normalverteilung mithilfe des D'Agostino Pearson Tests ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Datensätzen wurde der Mann-Whitney Test angewendet. Für alle statistischen Auswertungen wurde ein 95%-iges Konfidenzintervall gewählt. Die mit Sternchen gekennzeichneten Signifikanzen beziehen sich auf folgende Signifikanzniveaus: *: $p = 0,01-0,05$; **: $p = 0,001-0,01$; ***: $p = <0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Die Grundlage dieser Arbeit

Dieser Arbeit liegen Patientendaten und Material aus dem Seaver Autism Center des Mount Sinai Hospitals in New York zugrunde. Die Arbeitsgruppe von Prof. Joseph Buxbaum führte eine klinische Studie, „Prospective investigation of autism and genotype-phenotype correlations in 22q13 deletion syndrome and *SHANK3* deficiency“, an Patienten mit Verdacht auf Autismus-Spektrum-Störungen durch. 32 Patienten mit einer *SHANK3* Defizienz wurden von einem Team aus Kinderpsychiatern, Neurologen, klinischen Genetikern, Molekulargenetikern und Psychologen untersucht. Drei der untersuchten Patienten wiesen keine *SHANK3* Deletionen auf, sondern Punktmutationen, die zu einem Stopp-Codon an einer jeweils unterschiedlichen Stelle innerhalb der *SHANK3* Gensequenz führen. Während die klinischen Daten der Patienten mit den Mutationen c.1527G>A und c.2497delG von Soorya et al. [71] bereits veröffentlicht wurden, ist der Patient mit der c.5008A>T Mutation nachträglich aufgenommen worden und wird erstmals im Rahmen dieser Promotion beschrieben. Diese drei Patienten rückten in den Fokus weiterführender molekularbiologischer Analysen, für die sich das Labor von Prof. Buxbaum an Prof. Böckers (Anatomie und Zellbiologie Universität Ulm) wandte.

Zunächst soll auf Grundlage der Daten aus dem Seaver Autism Center auf die Klinik dieser drei Patienten eingegangen werden, bevor genetische und molekularbiologische Ergebnisse besprochen werden.

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind ebenfalls in der Publikation „Cochoy DM, Kolevzon A, Kajiwara Y, Schoen M, Pascual-Lucas M, Lurie S, Buxbaum JD, Boeckers TM, Schmeisser MJ: **Phenotypic and functional analysis of *SHANK3* stop mutations identified in individuals with ASD and/or ID.** Mol Autism 6: 23 (2015)“ erschienen.

3.1.1 Patient 1 (*SHANK3* c.1527G>A Mutation)

Es handelte sich zum Zeitpunkt der Untersuchung im Seaver Autism Center um einen acht Jahre alten Jungen. Peripartal (Geburt per Sectio) traten keine Komplikationen oder Infektionen auf. Die Entwicklung seiner motorischen Fähigkeiten war von Beginn an verlangsamt. Mit zwölf Monaten begann er sich aufzusetzen, mit achtzehn Monaten zu krabbeln und mit zwei Jahren zu laufen.

Ergebnisse

Mit drei Jahren konnte er einzelne Wörter sprechen. Bis zum Alter von fünf Jahren vergrößerte sich sein Wortschatz und nahm seitdem wieder langsam ab. Seine heutigen Fähigkeiten gleichen denen von Kindern zwischen sechs und 32 Monaten. Er ist nicht in der Lage reziprok sozial zu interagieren, hält aber Augenkontakt zu anderen Menschen und fühlt sich in der Umgebung von Erwachsenen am wohlsten. An Kindern seines Alters zeigt er kein Interesse. Er wird als gut gelauntes und hyperaktives Kind beschrieben. Obwohl sich seine Hyperaktivität in den letzten Jahren gebessert hat, ist er nicht in der Lage, sich auf etwas zu fokussieren. Er kann sich verbal kaum äußern und greift auf eine eigene Zeichensprache zurück, um seine Bedürfnisse zu verdeutlichen. In allen Bereichen des alltäglichen Lebens ist Hilfe notwendig, aber es sind Fortschritte in seinen grob- und feinmotorischen Fähigkeiten zu erkennen, sodass er sich mittlerweile am An- und Ausziehen beteiligen kann. Ab einem Alter von zwölf Monaten erhielt er Therapien in verschiedenen Bereichen und besucht derzeit eine Schule für autistische Kinder.

Psychiatrische Diagnostik:

Mullen Scales of Early Learning

Vineland Adaptive Behavior Scales, Survey Form – Second Edition (Vineland 2)

Die Diagnose dieses Patienten nach DSM-IV lautet:

Achse 1: Autistische Störung

Achse 2: Geistige Behinderung

3.1.2 Patient 2 (*SHANK3* c.2497delG Mutation)

Dieser männliche Patient war zum Zeitpunkt der Diagnostik im Seaver Autism Center sieben Jahre alt. Nach einer unauffälligen Schwangerschaft kam er in der 40. Woche durch eine vaginale Entbindung zur Welt. Die Mutter war zum Zeitpunkt der Geburt 31 Jahre, der Vater 35 Jahre alt. Es sind keine perinatalen Komplikationen, frühe Epilepsie, Infektionen oder Kopftraumata bekannt. Mutter, Vater und die zwei älteren Schwestern sind gesund, nur eine der Schwestern leidet unter Zöliakie, Allergien und Lernschwierigkeiten. Im Alter von sechs

Ergebnisse

Monaten fiel den Eltern der schwache Muskeltonus ihres Kindes auf, außerdem gab es Schwierigkeiten beim Füttern, die bis zum neunten Lebensmonat die Gabe von Flüssignahrung erforderlich machten. Auch heute noch bestehen große Probleme bei der Nahrungsaufnahme, weil der Patient das Essen im Mund ansammelt und nicht herunterschluckt. 2011 wurde deshalb eine PEG (perkutane endoskopische Gastrostomie) gelegt, um die regelmäßige Nahrungsaufnahme zu gewährleisten. Ohne vorher gekrabbelt zu haben, lernte er mit ca. fünfzehn Monaten laufen, bis heute hat er diese Fähigkeit kaum erhalten können. Verbal kann er sich nicht verständlich äußern, er hat aber einige Wörter erfunden, die für „bitte“, „danke“, „mehr“ usw. stehen. Er versteht mehr, als er selber ausdrücken könnte, ist aber nicht in der Lage Anweisungen und Aufforderungen nachzukommen. Vom PECS (Picture Exchange Communication System) kann er keinen Gebrauch machen. Im Alter von sechs Jahren gingen ihm viele seiner bis dahin erlangten Fähigkeiten wieder verloren. Zeitgleich zu dieser Regression begannen seine epileptischen Anfälle. Trotz der zunehmenden Behinderung, besteht auch heute noch eine soziale Beteiligung. Bei Interesse nimmt er Augenkontakt auf, lächelt oder winkt. Um aggressive und impulsive Ausbrüche zu verringern, in denen er andere Menschen anfasst und an den Haaren zieht, ist eine streng eingehaltene, tägliche Routine und die familiäre Umgebung sehr wichtig. Bei Ärger oder Frust neigt er zur Selbstverletzung. Der Patient kann sich nicht länger als 40-60 Sekunden auf etwas konzentrieren, ist aktiv und ruhelos. Er zeigt geringes Interesse an Spielzeug, interessiert sich aber für elektronische Geräte und das Telefon. Wenn er auf sich alleine gestellt ist, untersucht er Objekte in seiner Umgebung mit den Händen und dem Mund und nimmt Gegenstände aus ihren Verpackungen heraus. Es sind außerdem repetitive motorische und verbale Verhaltensweisen (z.B. Kreischen), Schlafstörungen und eine hohe Schmerztoleranz bekannt. Dinge des alltäglichen Lebens, wie der Toilettengang oder An- und Ausziehen sind nicht ohne Hilfe möglich. Seit frühester Kindheit ist er dauerhaft in Therapien und besuchte besondere Kindergärten und die Vorschule.

Nach vielen fehlgeschlagenen Versuchen von Psychiatern und Ärzten die Epilepsie medikamentös einzudämmen, ist er heute mit Divalproexnatrium 512 mg täglich, Lamotrigin 25 mg täglich und Diazepam 3 mg täglich gut eingestellt.

Ergebnisse

Psychiatrische Diagnostik:

Autism Diagnostic Interview (ADI)

Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS)

Cognitive Functioning: Mullen Scales of Early Learning, AGS Edition

Vineland (2)

Die Diagnose dieses Patienten nach DSM-IV lautet:

Achse 1: /

Achse 2: Geistige Behinderung

Achse 3: Phelan McDermid Syndrom, Epilepsie, GERD

3.1.3 Patient 3 (*SHANK3* c.5008A>T Mutation)

Auch der dritte Patient ist männlich und zum Zeitpunkt der diagnostischen Erhebung zwölf Jahre alt. Er wurde in der 40. Schwangerschaftswoche per Sectio geboren. Indikation zur Sectio war die um seinen Fuß gewundene Nabelschnur. Außerdem gab es keine perinatalen Komplikationen. Die Mutter war zum Zeitpunkt der Geburt 33 Jahre, der Vater 36 Jahre alt. In seiner Familie sind keine kognitiven Syndrome oder geistige Behinderung bekannt. Seine Mutter hat eine Hashimoto Hypothyreose und einen Typ 1 Diabetes, sein Vater und seine Schwester sind gesund. Nur bei Verwandten des Vaters sind Verzögerungen der Sprachentwicklung aufgetreten. In einem Alter von zweieinhalb Jahren machte sich die Mutter erstmals Sorgen um die Entwicklung ihres Sohnes, weil er ein sehr schwieriges Kind war, das sich schlecht füttern ließ, Schlafprobleme hatte und häufig erbrechen musste. Bis zum achtzehnten Lebensmonat war die Sprachentwicklung gesunden Kindern ebenbürtig, ließ von diesem Zeitpunkt aber kontinuierlich nach. Heute kann er einige Wörter lesen und erkennen und nutzt zur Verständigung überwiegend das PECS und eine Zeichensprache. Auch motorische und mimische Fähigkeiten entwickelten sich zeitgemäß, ließen aber mit dem Beginn der epileptischen Anfälle im Alter von sieben Jahren deutlich nach. Er litt phasenweise unter starker Muskelschwäche, sodass Laufen nicht

Ergebnisse

mehr möglich war. Diese Symptomatik konnte aber durch die Gabe von 4-Glutathion verbessert werden. Im sozialen Miteinander zieht er die Gesellschaft von Männern der von Frauen vor. An Kindern seines Alters zeigt er kein Interesse und hält sich lieber in der Gegenwart von Erwachsenen auf bzw. verbringt Zeit alleine. Trotz des Desinteresses an Kindern, hat er eine enge Beziehung zu seiner zwei Jahre jüngeren Schwester. Aggressives Verhalten ist leicht zu provozieren. In diesem Fall beißt er in sein Hemd oder auch andere Menschen. Da seine motorischen Fähigkeiten stark eingeschränkt sind, braucht er bei allen alltäglichen Verrichtungen Hilfe. Außerdem zeigt er stabile, repetitive Verhaltensweisen wie z.B. Klatschen, Schaukeln, Kauen, Grinsen oder er gibt verschiedene Laute von sich und sieht oder hört sich immer wieder dieselben Beiträge im Fernsehen oder Radio an. Neben einigen Medikamenten zur Behandlung seiner Komorbiditäten (siehe Tabelle 4) nimmt er Valproat 250 mg morgens und nachmittags und 500 mg zur Nacht ein.

Interventionen begannen ab einem Alter von zweieinhalb Jahren, schienen die Situation aber zunächst dahingehend zu verschlimmern, dass sein Aggressionspotential deutlich zunahm. Seitdem erhält er Physio- und Sprachtherapie und ist derzeit in einer Schule für geistig behinderte Kinder mit einer 1:1 Betreuung.

Psychiatrische Diagnostik:

ADI-Revised

ADOS

Mullen Scales of Early Learning

Vinland 2

Die Diagnose dieses Patienten nach DSM-IV lautet:

Achse 1: Autismus

Achse 2: Geistige Behinderung

Achse 3: Phelan McDermid Syndrom, Epilepsie, Ekzeme, chronische Diarrhö

Ergebnisse

Tab. 3 Dysmorphien der drei untersuchten Patienten mit den Mutationen im *SHANK3* Gen G1527A, 2497delG und A5008T. Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

Mutation	Hypertelorismus	Breiter Nasenrücken	Lange Wimpern	Ohranomalien	Volle Lippen	Epikanthus	Makrocephalie	Dolichocephalie	Kleinwüchsig	2-3 Syndaktylie der Zehen	5. Finger Klindaktylie	Tiefliegende Augen
2497delG								x	x			
G1527A	x	x	x	x	x	x	x					
A5008T										x	x	x

Tab. 4 Komorbiditäten der drei untersuchten Patienten mit den Mutationen im *SHANK3* Gen G1527A, 2497delG und A5008T. Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

Mutation	Repetitives Verhalten	Schmerzunempfindlichkeit	Hypotonie	Hyperaktivität	Aggression	GERD	Wiederkehrende URTIs	Schlafstörungen	Obstipation/Diarrhö	Epilepsie	Nahrungsunverträglichkeit	Ekzeme
2497delG	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
G1527A	x	x		x								
A5008T	x		x		x		x	x	x	x	x	x

3.2 Molekulargenetischer Hintergrund

Für die Mutationen *SHANK3* c.1527G>A, *SHANK3* c.2497delG und *SHANK3* c.5008A>T werden die Abkürzungen G1527A, 2497delG und A5008T verwendet. Diese Abkürzungen beschreiben sowohl die DNA-Konstrukte als auch die Fusionsproteine und werden als Synonym für die jeweiligen Patienten oder transfizierte Neurone verwendet. „*SHANK3*“ steht im Folgenden für die Überexpression der humanen *SHANK3a*-Sequenz, „SHANK3“ für das daraus resultierende Fusionsprotein (*SHANK3a* Isoform). „*Shank3*“ wird für das *Shank3a*-

Ergebnisse

Konstrukt von *Rattus norvegicus* verwendet und „Shank3“ für das Fusionsprotein (Shank3a Isoform), das auf der Ratten-DNA-Sequenz beruht.

Bei den Patienten G1527A und 2497delG liegen nachweislich *de novo* Mutationen vor. Auch für den A5008T Patienten wird eine *de novo* Mutation angenommen (die Mutter ist jedenfalls nicht betroffen), konnte bisher aber mangels Kooperation des Vaters noch nicht validiert werden. Alle drei Mutationen sind Punktmutationen im Gen für *SHANK3* auf dem Chromosom 22q13. Das Genom dieser Patienten wurde vollständig nach Sanger sequenziert, wobei bei dem G1527A Patienten zusätzlich eine 17q12 Mikroduplikation festgestellt wurde. Diese Mikroduplikation führt nicht zwangsläufig zu einem Phänotyp. In den meisten Fällen verursacht sie aber u.a. eine Entwicklungsverzögerung, geistige Behinderung, Mikrocephalie, Epilepsie und Hypotonie. Insofern ist die klinische Symptomatik dieses Patienten sehr wahrscheinlich nicht ausschließlich auf seine *SHANK3* Mutation zurückzuführen, was bei einer möglichen Korrelation zwischen molekularbiologischen Ergebnissen und dem klinischen Bild berücksichtigt werden muss.

Das Labor von Prof. Buxbaum ließ die mutierten *SHANK3* Gensequenzen synthetisieren und in ein GFP-Vektorsystem klonieren. In die synthetische *SHANK3a* Sequenz (kodierend für alle *SHANK3* Proteindomänen) wurde nach dem Start-Codon (ATG) zusätzlich ein zehn Aminosäuren großer Myc-Tag integriert. Dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Ulm wurden DNA-Konstrukte nach dem folgenden, stark vereinfachten Schema zugeschickt:

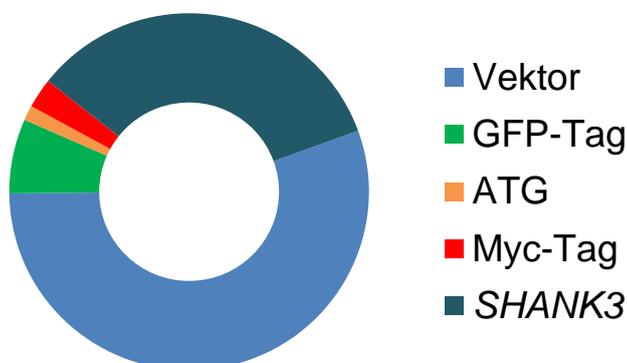


Abb. 4 Modell des Vektors. Was in der Abbildung als *SHANK3* gekennzeichnet ist, war eine der vier Genvarianten (Wildtyp-*SHANK3a*=*SHANK3*, G1527A, 2497delG oder A5008T). GFP: Green fluorescent protein. ATG: Start-Codon.

Ergebnisse

Der G1527A Mutation liegt ein Basenaustausch von einem Guanin zu einem Adenin in Exon 12 an der Nukleotidposition 1527 zugrunde. Dieser Basenaustausch verursacht eine Nonsense-Mutation, die nach 509 Aminosäuren in der Mitte der SH3-Domäne zum Abbruch der Proteinsynthese führt. Dieses Abbruchprotein hat ein errechnetes Molekulargewicht von 56 kDa. Im Vergleich dazu umfasst Wildtyp-SHANK3a 1741 Aminosäuren und weist ein errechnetes Molekulargewicht von 190 kDa auf.

Die 2497delG Mutation ist eine Frameshift-Mutation, die durch die Deletion eines Guanins in Exon 21 an der Nukleotidposition 2497 entsteht. Der Frameshift führt nach 891 Aminosäuren zu einem Stopp-Codon und damit zum Abbruch der Proteinsynthese. Das errechnete Molekulargewicht dieses Proteins beträgt 98 kDa.

Die A5008T Mutation beruht auf einem Basenaustausch in Exon 22 an der Nukleotidposition 5008. Der Austausch eines Adenins gegen ein Thymin ändert das Codon für Lysin in ein Stopp-Codon. Das Abbruchprotein besteht aus 1670 Aminosäuren und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 185 kDa.

Zum besseren Verständnis der Mutationen sind im Folgenden die Aminosäuresequenzen der Fusionsproteine mit den markierten Mutationsstellen aufgeführt.

G1527A

MEQKLI**SEEDL**DGPGASAVVVRVGI PDLQQTKCLRLDPAAPVWAAKQRVLCALNHSLQDA
LNYGLFQPPSRGRAGKFLDEERLLQEYPPNLDTPLPYLEFRYKRRVYAQNLI DDKQFAKL
HTKANLKKFMDYVQLHSTDKVARLLDKGLDPNFHDPDSGECPLSLAAQLDNATDLLKVLK
NGGAHLDFRTRDGLTAVHCATRQRNAAAALTLLDLGASPDYKDSRGLTPLYHSALGGGDA
LCCLELLHDHAQLGITDENGWQEIHQACRFQGHVQHLEHLLFYGADMGAQNASGNTALHIC
ALYNQESCARVLLFRGANRDVRNYSQTAFQVAI IAGNFELAEVIKTHKSDVVPFRETP
SYAKRRRLAGPSGLASPRPLQRSASDINLKGEAQAASPGPSLRSLPHQLLLQRLQEEKD
RDRDADQESNISGPLAGRAGQSKI SPSPGGPGPAPGPGPAPPAPPAPPAPPAPPAPP
VPGRKFI**AVKAHSPQGE**GEIPLHR**GEAVK**VLSIGEGGF **Stopp**
Trp zu TGA durch einen G>A Austausch (Position 1527nt, 509aa)

2497delG

MEQKLI**SEEDL**DGPGASAVVVRVGI PDLQQTKCLRLDPAAPVWAAKQRVLCALNHSLQDA
LNYGLFQPPSRGRAGKFLDEERLLQEYPPNLDTPLPYLEFRYKRRVYAQNLI DDKQFAKL
HTKANLKKFMDYVQLHSTDKVARLLDKGLDPNFHDPDSGECPLSLAAQLDNATDLLKVLK
NGGAHLDFRTRDGLTAVHCATRQRNAAAALTLLDLGASPDYKDSRGLTPLYHSALGGGDA
LCCLELLHDHAQLGITDENGWQEIHQACRFQGHVQHLEHLLFYGADMGAQNASGNTALHIC
ALYNQESCARVLLFRGANRDVRNYSQTAFQVAI IAGNFELAEVIKTHKSDVVPFRETP
SYAKRRRLAGPSGLASPRPLQRSASDINLKGEAQAASPGPSLRSLPHQLLLQRLQEEKD
RDRDADQESNISGPLAGRAGQSKI SPSPGGPGPAPGPGPAPPAPPAPPAPPAPPAPP
VPGRKFI**AVKAHSPQGE**GEIPLHR**GEAVK**VLSIGEGGF**WEGTVKGR**TGWFPADCV**EEVQ**M
RQHDTRPTE**REDRTKRLFRHYTVGSYD**SLTSHSDYVIDDKVA**VLQKRDHEG**FGF**VL**R**GAK**
AETPIEEFTPTPAFPALQYLESVD**VEGV**AWR**AGLRTGDFL**IEVNGVNVV**KVGHKQV**VALI
RQGGNRLVMKVSVTRKPEEDGARRRAPP**PKRAP**STTLTLRSK**SMTAELEELAS**IRRRK

Ergebnisse

GEKLDEMLAAAAEPTLRPDIADADSRAATVKQRPTSRRITPAEISSLFRQGLPGPEKLP
GSLRKGIPRTKSVGEDEKLASLLEGRFPRSTSMQDPVREGRGIPPPPQTAPPPPPAPYYF
DSG**RPRPSRRRPRRAAPTTRCAPASSPAWRRAWARALPACTSRARPSARCRIPSGRSARA**
P Stopp

Frameshift Mutation durch eine Basenpaardeletion, die zu einer veränderten
Sequenz führt und schließlich in einem Stopp-Codon endet
(Position 2497nt,891aa).

A5008T

MEQKLI**SEED**LDGPGASAVVVRVGI PDLQQTCKLRLDPAAPVWAAKQRVLCALNHSLQDA
LNYGLFQPPSRGRAGKFLDEERLLQEYPPNLDTPLPYLEFRYKRRVYAQNLI DDKQFAKL
HTKANLKKFMDYVQLHSTDKVARLLDKGLDPNFHDPDSGECPLSLAAQLDNATDLLKVLK
NGGAHLDFRTRDGLTAVHCATRQRNAAAALTLLDLGASPDYKDSRGLTPLYHSALGGGDA
LCCELLLHDHAQLGITDENGWQEIHQACRFQGHVQHLEHLLFYGADMGAQNASGNTALHIC
ALYNQESCARVLLFRGANRDVRNYSQTAFQVAI IAGNFELAEVIKTHKSDVVPFRETP
SYAKRRRLAGPSGLASPRPLQRSASDINLKGEAQPAASPGPSLRSLPHQLLLQRLQEEKD
RDRDADQESNISGFLAGRAGQSKI SPSGPGGPGPAPGPGPAPPAPPAPPPRGPKRKLYSA
VPGRKFIAVKAHSPQGEGEIPLHRGEAVKVLSIGEGGFWEQTVKGRGTGWFPADCVVEEVQM
RQHDTRPETREDRTKRLFRHYTVGSYDSLTSHSDYVIDDKVAVLQKRDHEGFGFVLRGAK
AETPIEEFTPTPAFPALQYLESVDVEGVAVRAGLRTGDFLIEVNGVNVVKVGHKQVVALI
RQGGNRLVMKVSVTRKPEEDGARRRAPPKRAPSTTLTLRSKSMTAELEELASIRRRK
GEKLDEMLAAAAEPTLRPDIADADSRAATVKQRPTSRRITPAEISSLFRQGLPGPEKLP
GSLRKGIPRTKSVGEDEKLASLLEGRFPRSTSMQDPVREGRGIPPPPQTAPPPPPAPYYF
DSGPPPAFSPPPPPGRAYDTRVRSFVKPGLEARLGAGAAGLYEPGAALGPLPYPERQKRAR
SMIILQDSAPESGDAPRPPPAATPPERPKRRPRPPGPDSPYANLGAFSASLFAPSKPQRR
KSPLVKQLQVEDAQERAALAVGSPGPGGGSFAREPSPTHRGPRPGGLDYGAGDGPGLAFG
GPGPAKDRRLEERRRSTVFLSVGAI EGSAPGADLPSLQPSRSIDERLLGTGPTAGRDLLL
PSPVSALKPLVSGPSLGPSTFIHPLTGKPLDPSSPLALALAAARERALSQAPSRSPPTP
VHSPDADRPGPLFVDVQARDPERGSLASPAFSPRSPAWIPVPARREAEKVPREERKSPED
KKSMILSVLDTSLQRPAGLIVVHATSNGQEPSRLGGAEERPGTPELAPAPMQSAVAEP
LPSRAQPPGGTPADAGPGQGSSEEEPELVFAVNLPPAQLSSSDEETREELARIGLVPPP
EEFANGVLLATPLAGPGPSPTTVPSPASGKPSSEPPPAPEESAADSGVEEADTRSSSDPHL
ETTSTISTVSSMSTLSSESGELTDHTSFADGHTFLEKPPVPPKPKLKSPLGKGPVTFR
DPLLKQSSDSELMAQQHHAASAGLASAAGPARPRYLQRRSKLWGDVSRGLPGPEDDK
PTVISELSSRLQQLNKDTRSLGEEPVGGLGSLLDPAKKSPIAAARLFSSSLGELSSISAQR
SPGGPGGGASYSVRPSGRYPVARRAPSPVKPASLERVEGLGAGAGGAGRPFGLTPPTILK
SSSL SIPHEPKVEFRVVRVSVSARSRS PPSPLPSPASGPGGAPGRRPFQOKPLQLWS

Stopp

Leu zu TGA durch einen A>T Austausch (Position 5008nt,1670aa)

SH3 Domäne

PDZ Domäne

SAM Domäne

Myc-Tag

Ergebnisse

Die aus dem Buxbaum-Labor zugesandten DNA-Konstrukte beinhalteten folgende SHANK3 Varianten:

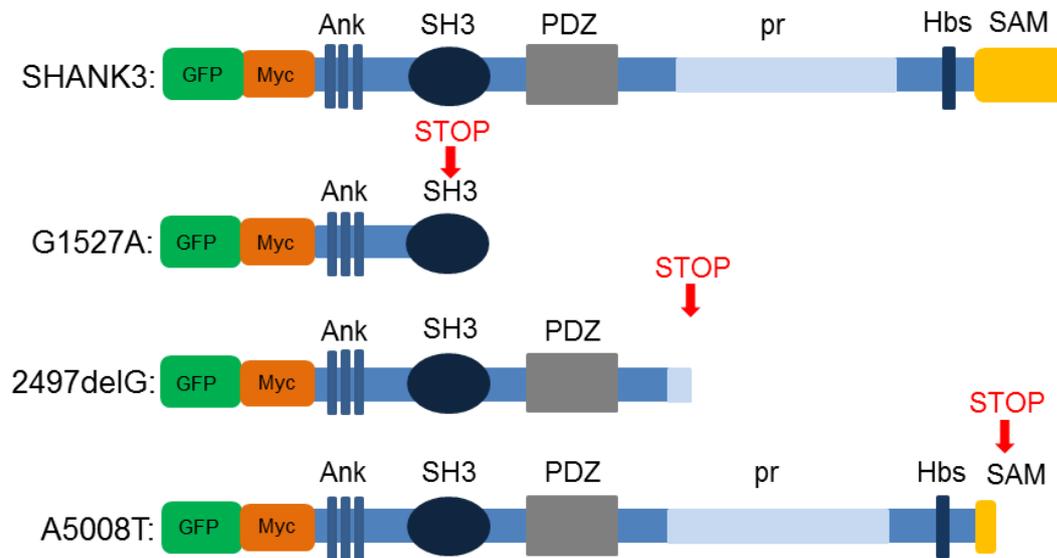


Abb. 5 Schematische Darstellung der vier SHANK3 Proteinvarianten. SHANK3 = Wildtypprotein (Isoform SHANK3a), die folgenden Modelle stellen die Fusionsproteine der drei Stopp-Mutationen dar. GFP: Green fluorescent protein, Myc: Myc-Tag, Ank: Ankyrin-repeats, SH3: SH3-Domäne, PDZ: PDZ-Domäne, pr: Prolin-reiche Region, Hbs: Homer-binding-site, C: Cortactin-binding-site, SAM: Sterile-alpha-motif. Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

Die G1527A Mutation führt zu einem Abbruch der Proteinsynthese in der Mitte der SH3-Region. 2497delG endet nach der PDZ-Domäne und kurz nach Beginn der Prolin-reichen Region. Das A5008T Protein bricht nach den ersten drei Aminosäuren der SAM-Domäne ab. Damit liegen drei Abbruchproteine vor, denen verschieden große Abschnitte des C-terminalen Endes von SHANK3 fehlen. In allen folgenden Analysen wurden diese drei mutierten Proteine mit dem humanen SHANK3a Wildtypprotein, in einigen Fällen mit dem Shank3a Wildtypprotein von *Rattus norvegicus* und mit dem Green Fluorescent Protein (dem leeren GFP-Vektor) als Kontrolle verglichen.

3.3 Western Blot-Analyse

Das erste Experiment sollte klären, ob die SHANK3 Fusionsproteine auf Basis der jeweiligen cDNA von eukaryoten Zellen exprimiert werden können und ob die

Ergebnisse

errechneten Molekulargewichte mit den jeweils translatierten Fusionsproteinen übereinstimmen.

Dazu wurden HEK293T-Zellen mit den vier Konstrukten transfiziert und jeweils Zelllysate hergestellt. Die nachfolgende Western Blot Analyse sollte Auskunft über die zelluläre Expression und das Molekulargewicht der Fusionsproteine geben.

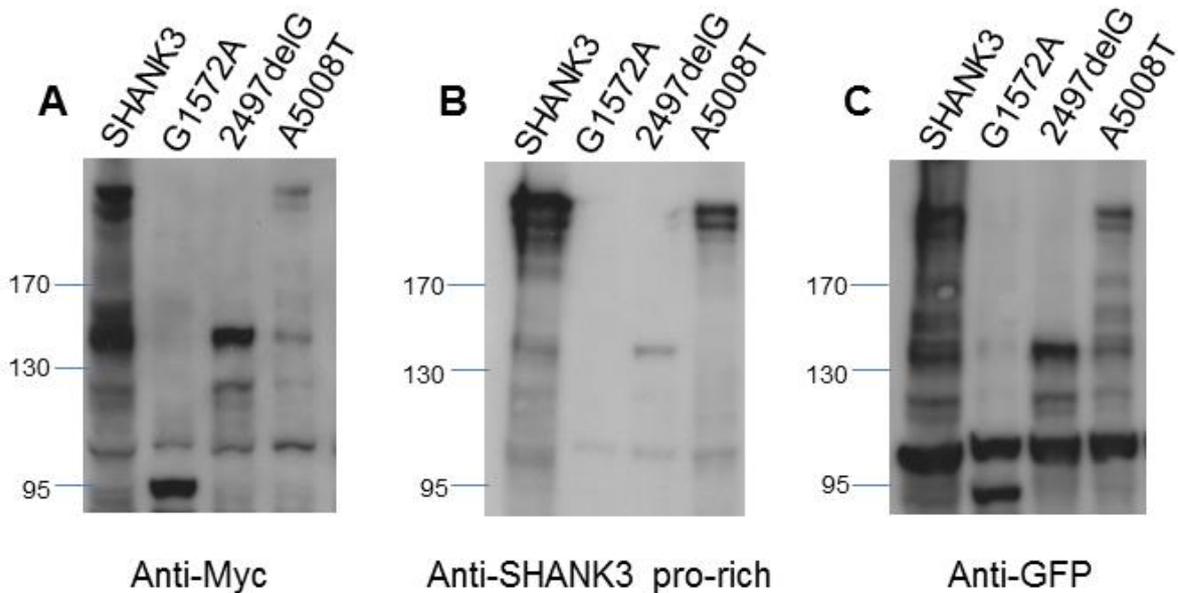


Abb. 6 Expressionsanalyse von transfiziertem HEK293T-Zelllysate im Western Blot. Die geladene Proteinmenge pro Spur betrug für alle Fusionsproteine jeweils 10 µg. Für den anti-Myc-Antikörper (ms) wurde eine 1:2000, für den anti-SHANK3-Pro-rich-Antikörper (rb) eine 1:30000 und für den anti-GFP-Antikörper (ms) eine 1:20000 Verdünnung hergestellt. GFP: Green fluorescent protein. Zahlenwerte in kDa = kilodalton. Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

Sowohl der anti-Myc- als auch der anti-GFP-Antikörper zeigten, dass die Fusionsproteine SHANK3, G1527A, 2497delG und A5008T in HEK-Zellen exprimiert wurden. Die Differenz zwischen den oben aufgeführten, errechneten Molekulargewichten und den Laufhöhen im Western Blot ist auf die Gewichtskomponente (ca. 30 kDa) des GFP-Tags zurückzuführen.

Der anti-SHANK3-Pro-rich-Antikörper diente als interne Kontrolle für die Abbruchproteine. Die drei Antigensequenzen dieses polyklonalen Antikörpers befinden sich innerhalb der Prolin-reichen Region von SHANK3, die G1527A vollkommen und 2497delG überwiegend fehlen. Demzufolge konnte dieser

Ergebnisse

Antikörper G1527A gar nicht und 2497delG nur sehr schwach detektieren. SHANK3 und A5008T wurden eindeutig vom Antikörper erkannt.

Die Hintergrundbanden der Westernblots (vor allem auf Höhe von ca. 100 kDa) wurden als unspezifisch interpretiert und sind möglicherweise durch Proteindegradation entstanden.

3.4 Lokalisationsstudien

Neben den Western Blot Analysen wurden auch Lokalisationsstudien in transfizierten HEK293T-Zellen durchgeführt. Ziel war es, anhand des GFP-Tags die subzelluläre Lokalisation der rekombinanten Fusionsproteine in HEK-Zellen herauszufinden.

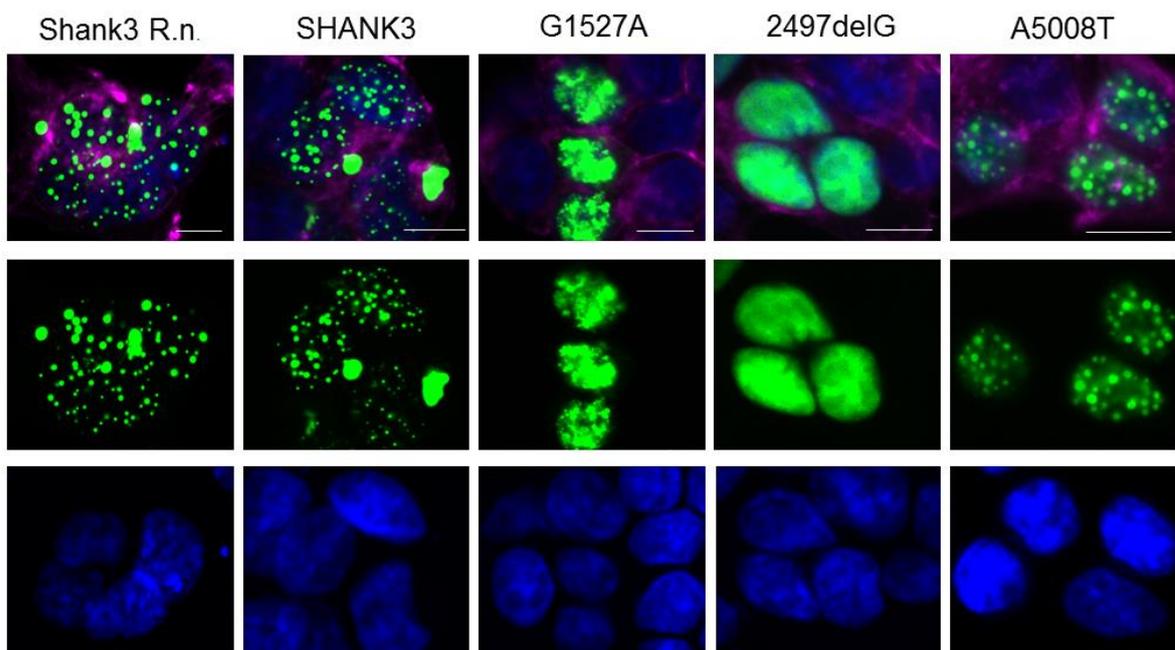


Abb. 7 Transfektion von HEK293T-Zellen mit 1 µg DNA pro Well. Die Transfektionsdauer betrug 48 h. Grünes Signal = jeweiliges SHANK3 Fusionsprotein, pinkes Signal = Aktin-Zytoskelett visualisiert über Phalloidin und blaues Signal = Zellkerne (DAPI). Der Maßstabsbalken beträgt 10 µm. Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

In HEK-Zellen bildeten SHANK3 und Shank3 R.n. jeweils in ähnlicher Verteilung Cluster. Shank3 von *Rattus norvegicus* diente als Kontrolle, da dessen Lokalisation in HEK- und COS7-Zellen bereits beschrieben wurde (s.u.). Beide Wildtypproteine lagerten sich in die Zellmembran und in die Membranen des

Ergebnisse

Endoplasmatischen Reticulums ein. Alle drei Fusionsproteine der Mutationen unterschieden sich von diesem Verteilungsbild (s. Abb. 7). Sowohl G1527A als auch 2497delG verteilten sich diffus im Bereich des nukleären Kompartiments. Auch A5008T lokalisierte ausschließlich kernnah, zeigte dabei aber eine ähnliche Clusterbildung wie die Wildtypen SHANK3 und Shank3.

Diese Ergebnisse beruhten ausschließlich auf dem optischen Eindruck, den man bei der Analyse der Mikroskopaufnahmen gewinnen konnte. Um die mögliche nukleäre Lokalisation der mutierten Fusionsproteine biochemisch nachzuweisen, wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt. Es konnten reine nukleäre und zytosolische Fraktionen (s. Abb. 8 A) aus transfizierten HEK-Zelllysaten hergestellt werden, die wie bereits unter 3.3 beschrieben für Western Blots verwendet wurden. Die Fraktionierung wurde mit zwei Antikörpern per Western Blot kontrolliert, und zwar mit einem Antikörper gegen das zytosolische Protein GAPDH und einem Antikörper gegen Histon H3, das ausschließlich in der nukleären Fraktion enthalten ist.

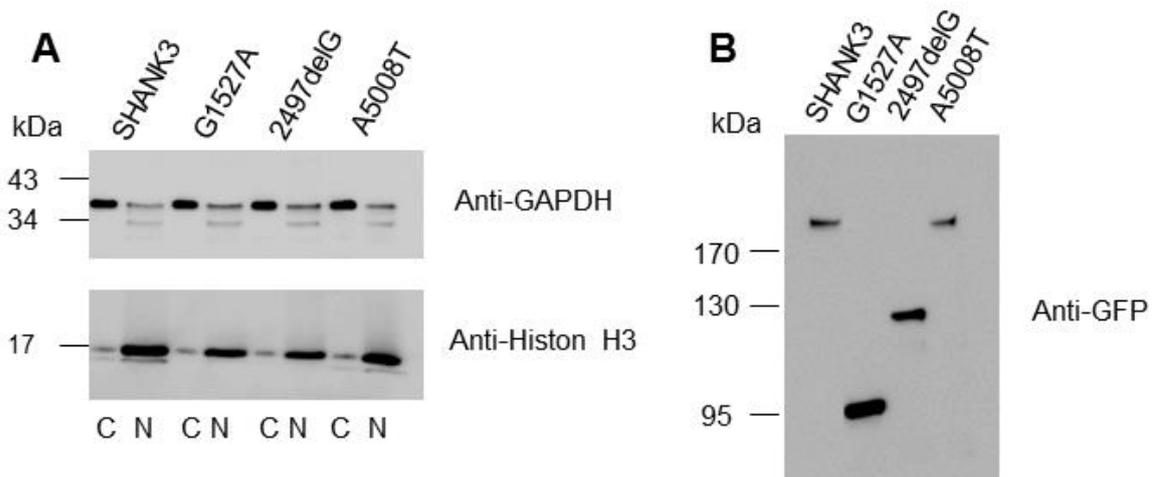


Abb. 8 A Lade- und Fraktionskontrolle transfizierter und fraktionierter HEK-Zelllysate im Western Blot. B Western Blot der nukleären Fraktionen. Es wurden die zytosolischen (C) und die nukleären (N) Fraktionen nebeneinander aufgetragen. Der Nachweis für die zytosolische Fraktion erfolgte mit dem Antikörper gegen GAPDH (1:1000 Verdünnung) und für die nukleäre Fraktion mit dem Antikörper gegen Histon H3 (1:1000 Verdünnung). GFP: Green fluorescent protein. Die geladene Proteinmenge betrug in allen Bedingungen in der nukleären Fraktion 5 μ g und in der zytosolischen Fraktion 20 μ g. kDa = kilodalton. Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

Ergebnisse

Abbildung 8 B zeigt einen Western Blot der nukleären Fraktionen von HEK-Zellen, die mit *SHANK3*, G1527A, 2497delG oder A5008T transfiziert worden waren. Da alle Fusionsproteine einen GFP-Tag tragen, konnten sie im Western Blot mit einem Anti-GFP-Antikörper detektiert werden. Es wurden pro Fraktion gleiche Proteinmengen geladen (siehe Kontrolle mit Anti-GAPDH und Anti-Histon H3, Abb. 8 A).

Dieses Western Blot-Ergebnis stärkte den aus den Mikroskopaufnahmen gewonnenen Eindruck, dass die Fusionsproteine im Zellkern lokalisieren. Es zeigte darüber hinaus, dass auch *SHANK3* zu einem gewissen Teil im Nukleus vorhanden ist.

Im nächsten Schritt galt es, die Lokalisation der Konstrukte in hippocampalen Neuronen zu untersuchen, dem Modell, in dem alle weiteren Experimente durchgeführt wurden. Die neuronale Kultur wurde hierzu jeweils gleichzeitig mit den GFP-getaggen *SHANK3* Konstrukten und dem „Füllkonstrukt“ DenMark, das den gesamten Dendritenbaum inklusive der Spines anfärbt (in der Abb. 9 in rot dargestellt), transfiziert.

Das GFP, Produkt des leeren GFP-Kontrollvektors, verteilte sich gleichmäßig im Zellkörper und im Dendritenbaum (s. Abb. 9). Es kam weder zu einer Clusterbildung noch zu einer synaptischen Lokalisation. *SHANK3* bildete über den gesamten Dendritenbaum hinweg punktförmige Cluster und lokalisierte vor allem in den dendritischen Spines.

Für G1527A und 2497delG zeigte sich in Neuronen das gleiche Bild wie in HEK-Zellen: Keine GFP-Signale im somato-dendritischen Kompartiment, sondern einzig ein GFP-Signal im Bereich des Nukleus.

Für A5008T ergab sich im Gegensatz zu dem aus den HEK293T-Zellen bekannten Verteilungsmuster ein anderes Bild: Es fanden sich sowohl GFP-Signale im Zellkörper als auch in den Dendriten. Dabei unterschied sich A5008T von *SHANK3* dahingehend, dass die Menge an GFP-Signalen in den Dendriten geringer (siehe 3.7.2) und im Zellkörper stärker angesammelt war. Es war nicht eindeutig zu erkennen, ob sich A5008T auch im Nukleus befand.

Ergebnisse

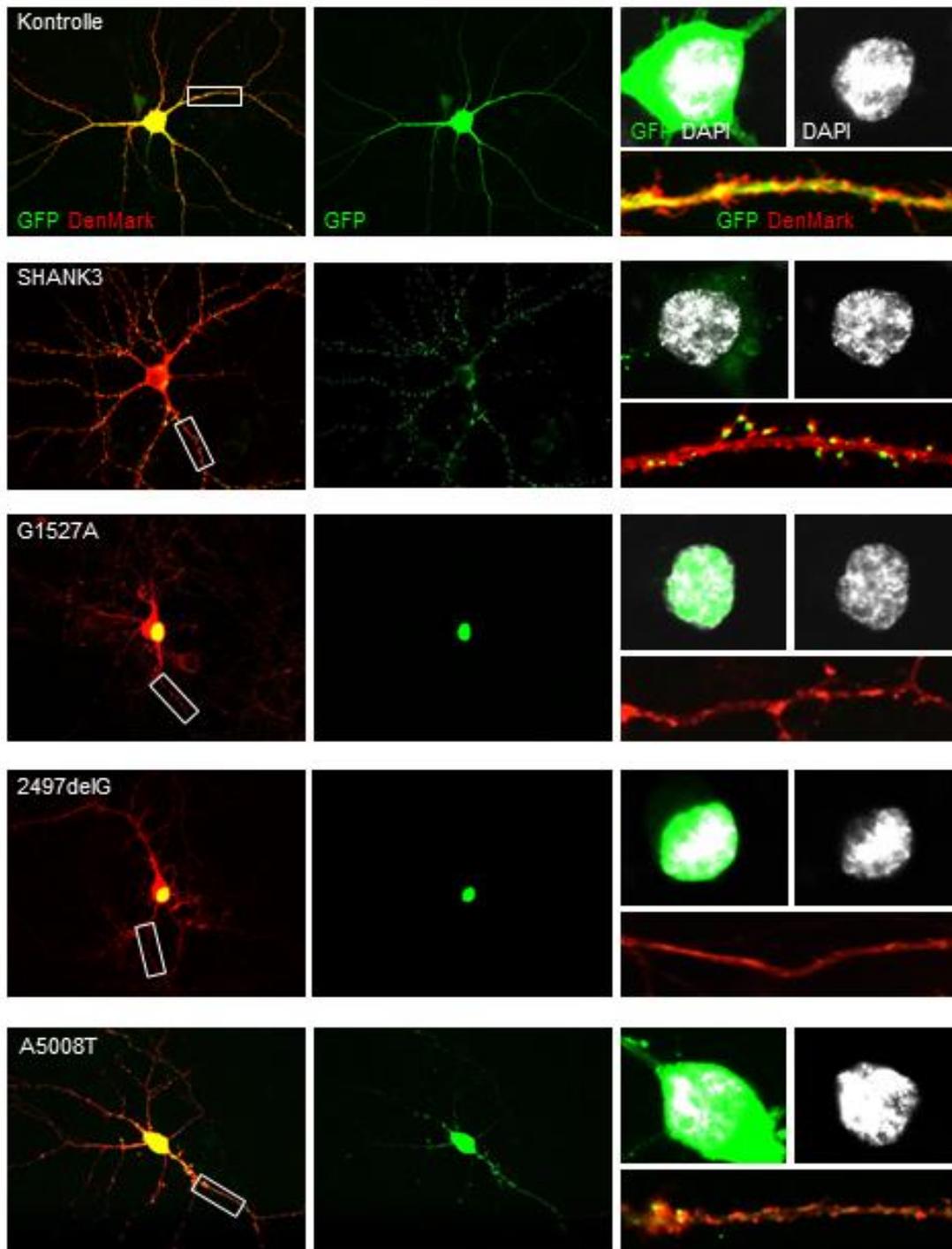


Abb. 9 Lokalisationsstudien zur Verteilung der Fusionsproteine in hippocampalen Neuronen, die aus achtzehn Tage alten Rattenembryonen präpariert und kultiviert wurden. Die Kotretransfektion fand an DIV 11 statt, an DIV 14 wurden die Neurone mit Paraformaldehyd fixiert. Transfiziert wurde mit 750 ng DNA, d.h. *SHANK3*, *G1527A*, *2497delG* und *A5008T* (grünes GFP-Signal) und mit 750 ng DenMark (rotes Signal) zum Auffüllen der Dendriten und Spines. In der linken Spalte ist ein überlagertes Bild aus den Fluoreszenzkanälen von GFP und DenMark dargestellt, in der mittleren Spalte nur das jeweilige *SHANK3* Konstrukt (GFP-Signal). In der rechten Spalte sind der mit DAPI angefärbte Zellkern (weiß), ein überlagertes Bild aus den Fluoreszenzkanälen von GFP und DAPI vom Zellkern und jeweils ein Dendritenausschnitt der hier abgebildeten Neurone gezeigt. Das

Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

Abgesehen von der unterschiedlichen Lokalisation der Fusionsproteine fielen beim Überblick über die transfizierten Neurone Ungleichheiten in der Form des Dendritenbaums auf. Während die Neurone, die mit dem Leervektor, *SHANK3* oder mit A5008T transfiziert worden waren, gesunde, weit verzweigte Dendritenbäume aufwiesen, sahen die Dendriten der mit den G1527A und 2497delG Konstrukten transfizierten Neurone verkümmert aus. Um diese Beobachtung weiter zu untersuchen und zu quantifizieren, wurden im Folgenden verschiedene morphologische Merkmale der Neurone untersucht.

3.5 Morphologische Untersuchung von Dendriten und Zellsoma

Die Komplexität des Dendritenbaums wurde mit der Sholl-Analyse erfasst. Ihr konnte man den Verzweigungsgrad und indirekt die Ausmaße der Dendriten entnehmen. Zunächst wurde die Kontrolle (GFP-Leervektor) mit *SHANK3* verglichen, mit dem Ergebnis, dass es bezüglich der Länge und der Verzweigung der Dendriten keinen signifikanten Unterschied gab (s. Abb. 10).

Die mutierten Fusionsproteine wurden sowohl mit der Kontrolle als auch mit *SHANK3* verglichen. Ab einer Entfernung vom Zellkern von 45 µm wiesen die mit dem G1527A Konstrukt transfizierten Neurone im Vergleich zur Kontrolle signifikant schwächer verzweigte Dendriten auf (s. Abb. 11). Der Unterschied von G1527A zu *SHANK3* war in einer Entfernung von 45-90 µm signifikant und fiel damit etwas geringer aus als der Unterschied von G1527A zur Kontrolle.

Ergebnisse

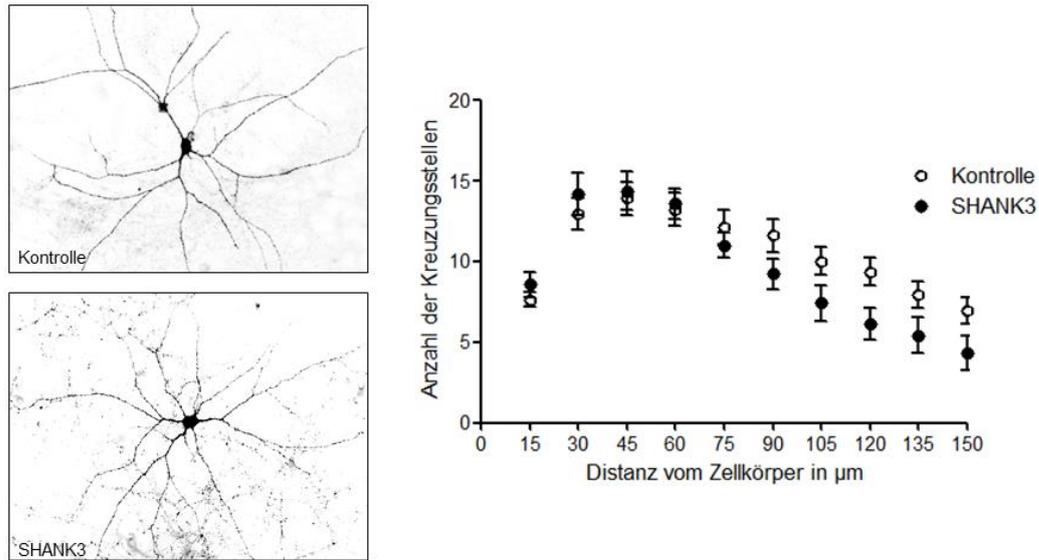


Abb. 10 Sholl-Analyse, Kontrolle und SHANK3 im Vergleich. Für SHANK3 wurden aus drei unabhängigen Experimenten pro Präparation sieben Neurone ausgewertet (n=21). Für die Kontrolle wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt und in den ersten drei Präparationen jeweils sieben und in der letzten elf Neurone ausgewertet (n=32). Für Abb 10 und 11 gilt: Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

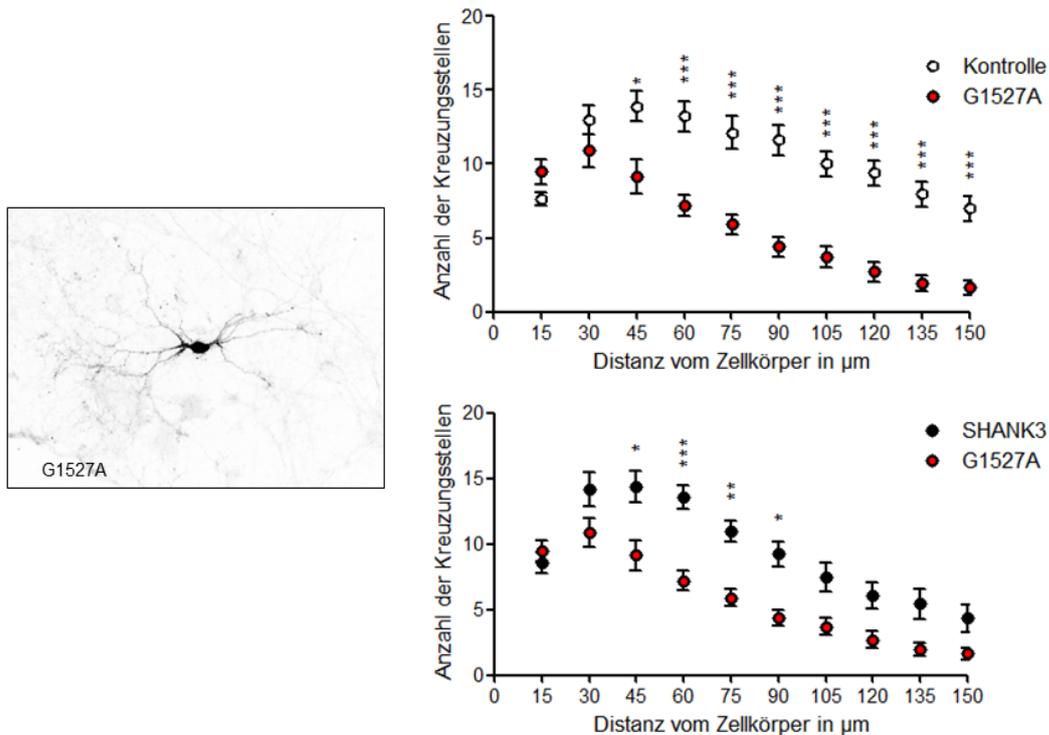


Abb. 11 Sholl-Analyse, G1527A im Vergleich mit der Kontrolle (oben) und mit SHANK3 (unten). Für die Anzahl der Experimente und ausgewerteter Neurone von SHANK3 und Kontrolle siehe oben. Für G1527A gilt: Drei Experimente, pro Präparation wurden sieben Neurone ausgewertet (n=21). [22]

Ergebnisse

Ein ähnliches Bild wie bei G1527A zeigte sich auch für 2497delG (s. Abb. 12). Verglichen mit der Kontrolle hatten Neurone, die mit dieser Mutation transfiziert worden waren, verkümmerte, kürzere und weniger verzweigte Dendriten. Auch im Vergleich zu SHANK3 war dieses Ergebnis im Abstand von 60-90 μm vom Zellkörper signifikant.

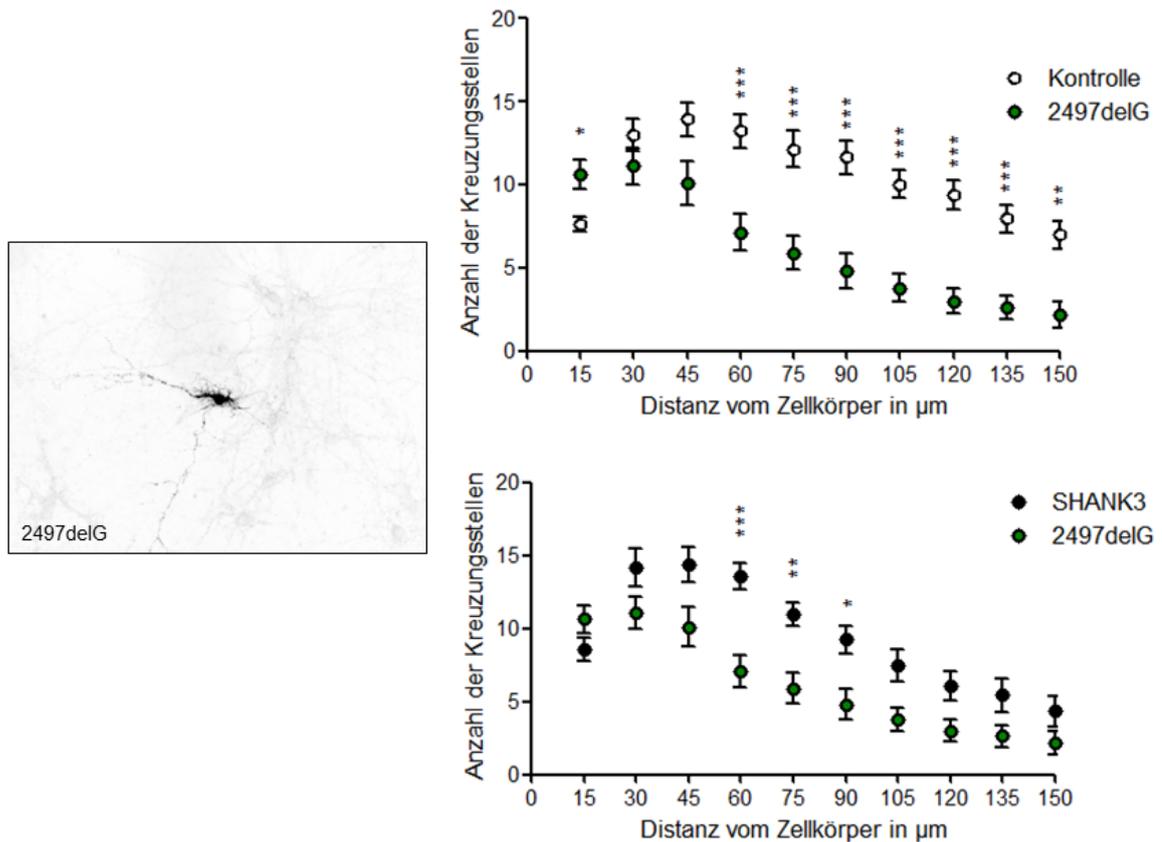


Abb. 12 Sholl-Analyse, 2497delG im Vergleich mit der Kontrolle (oben) und SHANK3 (unten). Für die Anzahl der Experimente und ausgewerteter Neurone von SHANK3 und Kontrolle siehe oben. Für 2497delG gilt: Drei Experimente, pro Präparation wurden sieben Neurone ausgewertet (n=21). Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

Ergebnisse

Die mit A5008T transfizierten Neurone zeigten gesunde und sehr weitverzweigte Dendriten (s. Abb. 13). Die Dendriten dieser Neurone waren sogar in einer Distanz ab 120 μm vom Zellkern signifikant stärker verzweigt als bei SHANK3 überexprimierenden Neuronen.

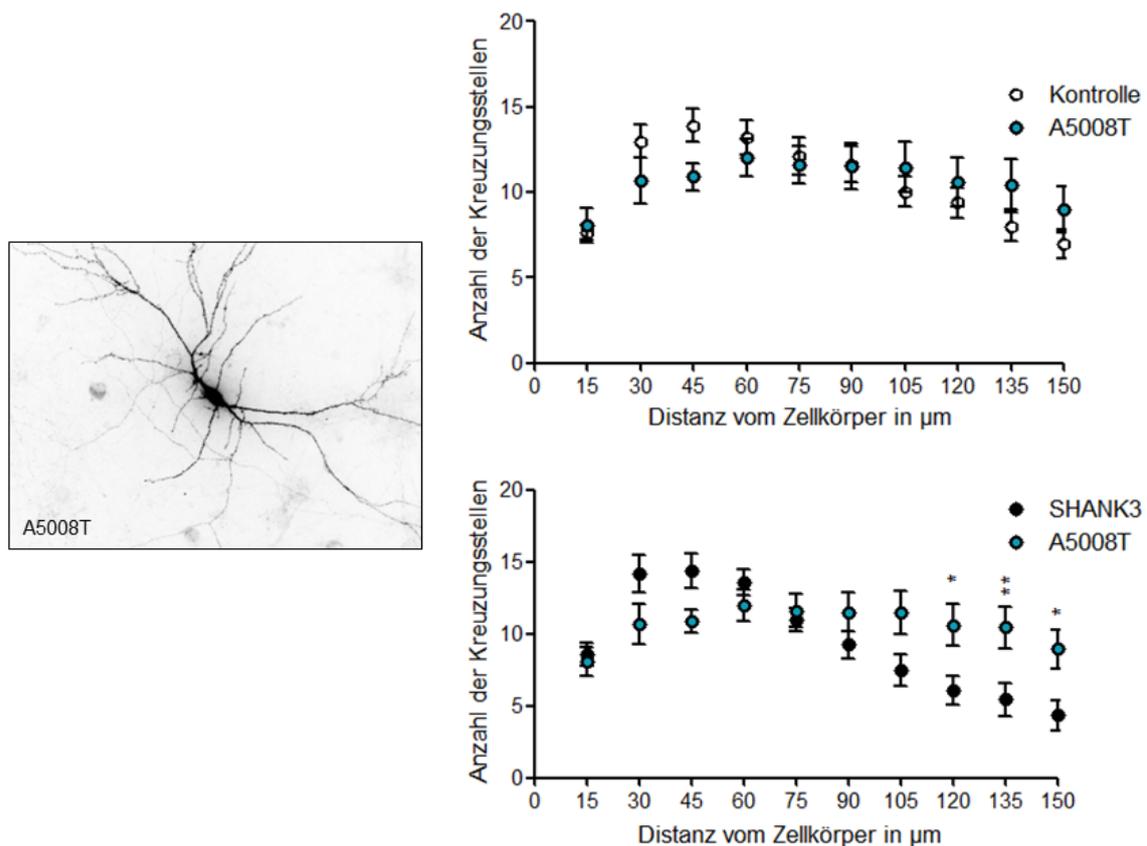


Abb. 13 Sholl-Analyse, A5008T im Vergleich mit der Kontrolle (oben) und SHANK3 (unten). Für die Anzahl der Experimente und ausgewerteter Neurone von SHANK3 und Kontrolle siehe oben. Für A5008T gilt: 2 Experimente, 1. Präparation: Acht Neurone wurden ausgewertet, 2. Präparation: Elf Neurone wurden ausgewertet ($n=19$). Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

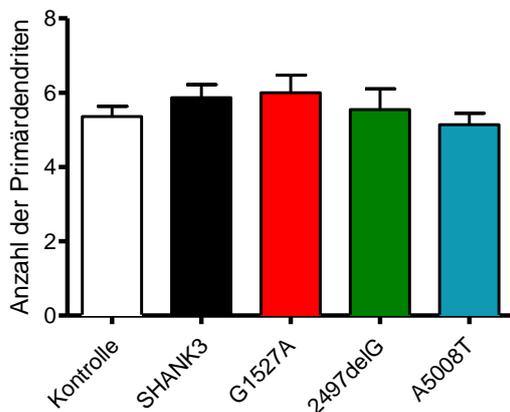
3.5.1 Anzahl der Primärdendriten

Aus der Sholl-Analyse war die Anzahl der einzelnen Dendritengenerationen nicht eindeutig abzulesen. Um hierzu eine quantitative Aussage treffen zu können, wurde die Anzahl der Primärdendriten ausgezählt (s. Abb. 14 A). Die Auswertung weiterer Dendritengenerationen scheiterte an der genauen Differenzierung der Dendriten. Wie die Sholl-Analyse schon vermuten ließ, gab es auf der Ebene der

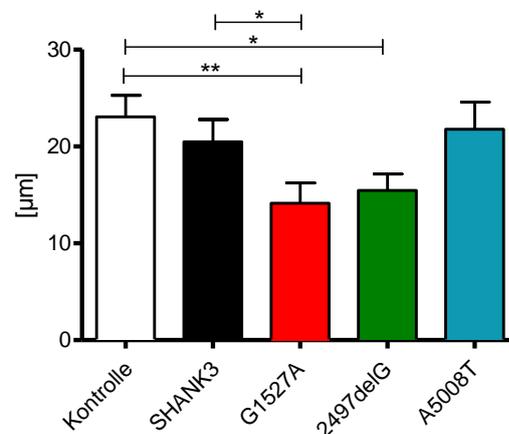
Ergebnisse

Primärdendriten keinen Unterschied bezüglich der Dendritenanzahl zwischen den verschieden transfizierten Neuronen.

A Anzahl der Primärdendriten



B Länge der Primärdendriten



C Umfang des Zellkerns

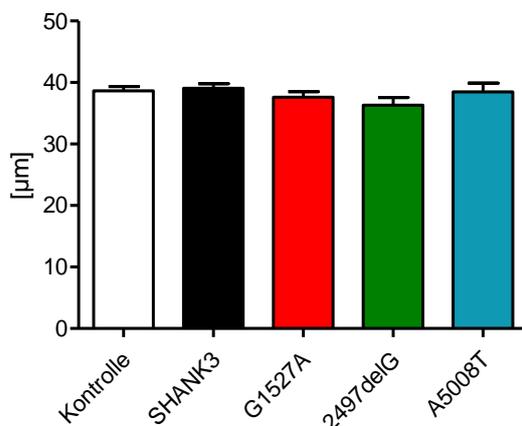


Abb. 14 Morphologische Auswertungen an transfizierten hippocampalen Neuronen, die aus achtzehn Tage alten Rattenembryonen präpariert und kultiviert wurden. Die Kotransfektion fand an DIV 11 statt, an DIV 14 wurden die Neurone mit Paraformaldehyd fixiert. Transfiziert wurde mit 750 ng *SHANK3* Konstrukt und 750 ng DenMark. Alle Auswertungen wurden an Neuronen durchgeführt, die mit der 40-fachen Vergrößerung des Imager Z1 Zeiss Fluoreszenzmikroskops aufgenommen wurden. Vermessen wurde im Programm AxioVision SE64 Rel.4.8. Für A,B, C und gilt: Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente ausgewertet. Für A und B wurden pro Präparation zweimal sieben und einmal acht Neurone ausgewertet (n=22). Für C wurden von jeder Präparation sieben Neurone ausgewertet (n=21). Für Abb. 14 A gilt: Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

3.5.2 Länge der Primärdendriten

Die Länge der Primärdendriten wurde als Distanz zwischen dem Zellkern und der ersten Verzweigung in Sekundärdendriten definiert. Bezüglich der Länge der Primärdendriten bestanden signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen transfizierten Neuronen (s. Abb.14 B). Die kürzesten Primärdendriten wiesen Neurone auf, die G1527A überexprimiert hatten. Überexpression von 2497delG führte ebenfalls zu signifikant kürzeren primären Dendriten als bei der Kontrolle. Es bestand kein Unterschied in der Primärdendritenlänge zwischen Neuronen, die A5008T, SHANK3 oder die Kontrolle überexprimierten.

3.5.3 Umfang des Zellkerns

Bei der Auswertung der aufgenommenen Neurone konnte man den Eindruck gewinnen, dass der Zellkern in Neuronen, die mit G1527A und 2497delG transfiziert worden waren größer sei, als bei der Transfektion mit den anderen Konstrukten. Dieser Eindruck entstand vermutlich, weil der Zellkern in diesen Neuronen mit dem GFP-getaggten Mutationsprotein ausgefüllt war. Das Ergebnis der Vermessung der Zellkerne konnte aber keine Unterschiede im Umfang des Zellkerns zwischen den verschiedenen transfizierten Neuronen zeigen (s. Abb 14C).

3.6 Veränderungen der Spines

Überexpression von G1527A und 2497delG führte jeweils zu morphologischen Veränderungen des Dendritenbaums. Dafür kann es verschiedene Ursachen geben, die an späterer Stelle erläutert werden. Um sich von den größeren morphologischen Einheiten des Neurons den kleineren zu zuwenden, wurden im Folgenden die Spines untersucht. Spines sind kleine Fortsätze der Dendriten, an deren Spitzen sich exzitatorische Synapsen befinden. Es ist bekannt, dass das in der postsynaptischen Dichte lokalisierte SHANK3 u.a. das Aktinzytoskelett innerhalb der Spines stabilisiert (s.o.). Durch die Veränderungen aufgrund der Mutationen ist möglicherweise die Verankerung des Aktins durch SHANK3 gestört und damit das Zytoskelett des Spines instabil, was zu morphologischen und funktionellen Veränderungen führen könnte. Darüber hinaus ist bekannt, dass SHANK3 zur Reifung von Spines beiträgt. Ein reifer und voll funktionsfähiger

Ergebnisse

Spine weist im Gegensatz zu unreifen, langen und dünnen Filopodien eine typische Pilzform auf. Daneben kommen andere, z.T. nicht eindeutig zuzuordnende Spineformen wie „stubby“ oder dünne Spines vor. Im Folgenden wurde jeweils die Dichte der Spines und der Filopodien an einem ca. 35 μm langen Sekundärdendriten bestimmt. Anschließend wurde die Länge der Spines und Filopodien gemessen. Zu den Spines wurden alle Fortsätze gezählt, die nicht Filopodien waren. Eine durchschnittliche Länge der Spines von ca. 1 μm durfte nicht überschritten werden, um zwischen dünnen Spines und Filopodien unterscheiden zu können.

Die Dichte der Spines war bei Neuronen, die mit G1527A oder 2497delG transfiziert worden waren sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch im Vergleich zu SHANK3 signifikant verringert. Es fanden sich etwa halb so viele Spines bei G1527A und 2497delG überexprimierenden Neuronen als bei Neuronen, die mit der Kontrolle und SHANK3 transfiziert worden waren. Neurone, die A5008T überexprimierten wiesen etwas weniger Spines auf als Neurone, die die Kontrolle und SHANK3 überexprimierten, aber nicht in signifikantem Ausmaß (s. Abb. 15 A).

Die Dichte der Filopodien war bei allen Bedingungen ähnlich, es ergaben sich also keine signifikanten Unterschiede in der Filopodienanzahl (s. Abb. 15 B).

Während Neurone, die mit dem Kontroll- und dem SHANK3 Konstrukt transfiziert worden waren, mehr als doppelt und Neurone, die A5008T überexprimierten dreimal so viele Spines wie Filopodien aufwiesen, lag das Verhältnis bei G1527A und 2497delG um etwa 1 bzw. $+ 0,3/- 0,06$ (s. Tab. 5). Zusammengesfasst ergab sich daraus folgende Konsequenz (s. Abb. 15 C): Neurone, die mit den G1527A und 2497delG Konstrukten transfiziert worden waren, wiesen eine geringere Anzahl dendritischer Fortsätze auf als die anderen Bedingungen. Ursache dafür war eine isolierte Verminderung der Spines bei Neuronen, die diese Mutationen überexprimierten. Die Filopodienanzahl hingegen war in allen Bedingung ähnlich. Neurone mit den beiden kurzen Fusionsproteinen hatten demzufolge sehr wahrscheinlich weniger ausgereifte und funktionelle Spines als die anderen Bedingungen.

Die Filopodienlänge war an Dendriten der mit SHANK3 transfizierten Neurone signifikant geringer als bei G1527A und 2497delG (s. Abb. 16 B). Filopodien von

Ergebnisse

über 3 μm Länge traten bei SHANK3 überexprimierenden Neuronen im Gegensatz zu allen anderen Bedingungen nur vereinzelt auf und hatten damit insgesamt die kürzesten Fortsätze von allen fünf Bedingungen.

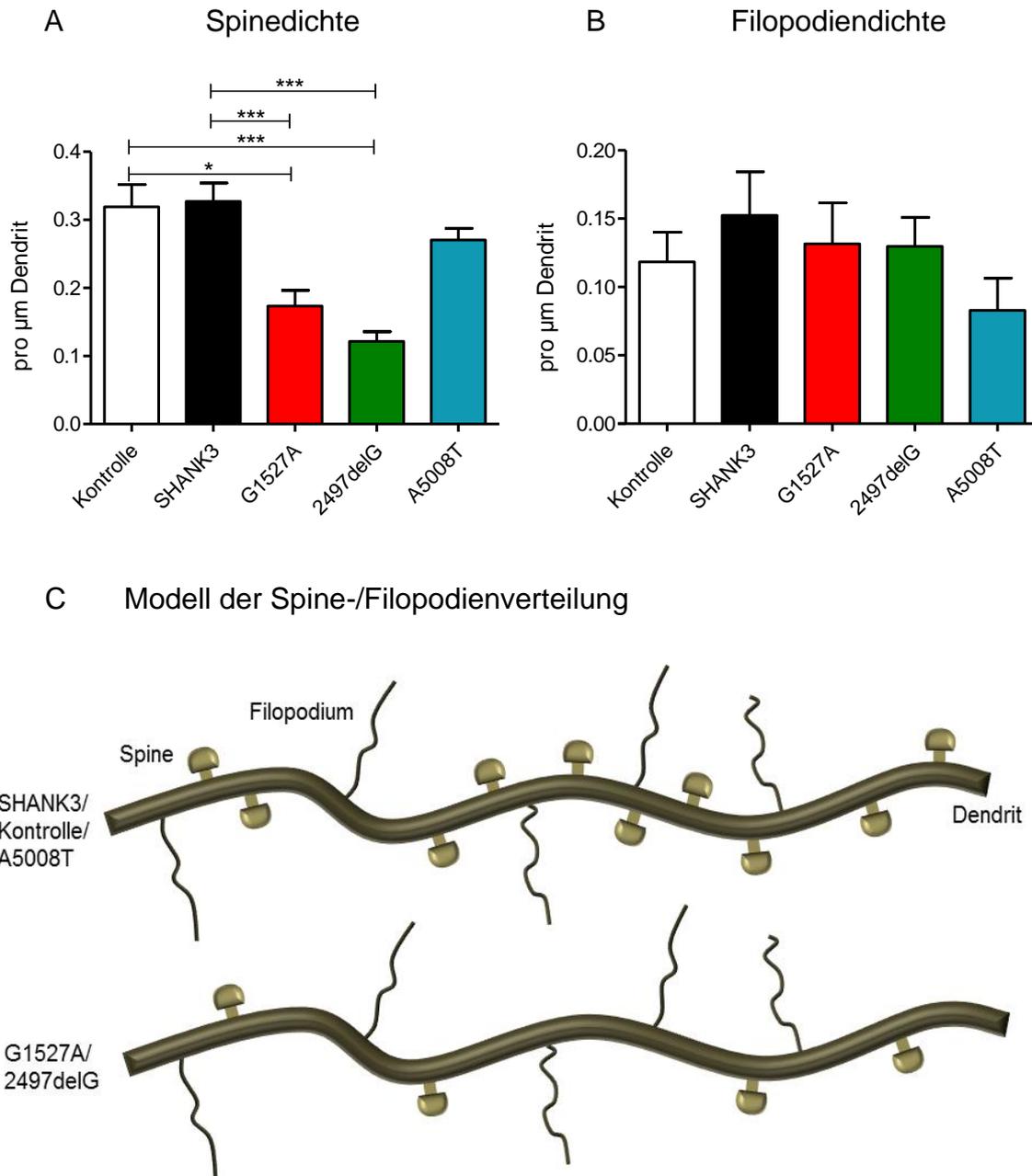


Abb. 15 A,B Auswertung der Spine- und Filopodiendichte. Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente ausgewertet und pro Präparation jeweils zwei Sekundärdendriten von jeweils fünf Neuronen vermessen (d.h. pro Konstrukt dreimal fünf Neurone, $n=15$). C Schematische Darstellung der Spine- und Filopodienverteilung am Dendriten.

Ergebnisse

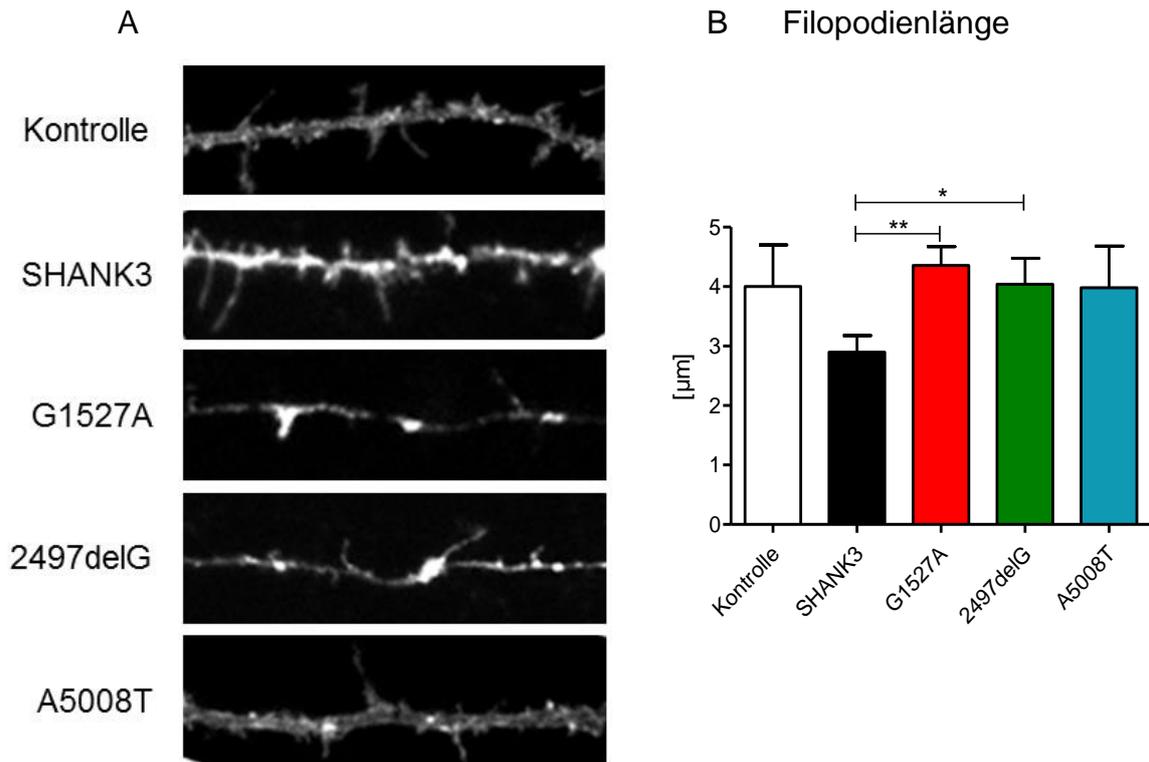


Abb. 16 A Dendritenausschnitte von Neuronen, die mit DenMark und den jeweiligen *SHANK3* Konstrukten kotransfiziert wurden (Transfektionsbedingungen s.o.). Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) [22]. B Vermessung der Filopodienlänge.

Tab. 5 Verhältnisse von Spines zu Filopodien. Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

Konstrukt	Mittelwerte der Spinedichte (Spines/µm)	Mittelwerte der Filopodiendichte (Spines/µm)	Verhältnis Spinedichte/ Filopodiendichte
Kontrolle	0,3192	0,1184	2,7
SHANK3	0,3271	0,1524	2,15
G1527A	0,1734	0,1316	1,32
2497delG	0,1215	0,1298	0,94
A5008T	0,2704	0,0829	3,26

3.7 Veränderungen der Synapsen

Um aus der Morphologie der Neurone und ihren Spines weitere Rückschlüsse auf die Funktionalität ableiten zu können, wurden im Folgenden exzitatorische und inhibitorische Synapsen an primären und sekundären Dendriten untersucht. Dazu wurden die Neurone nach der Transfektion und Fixierung immunzytochemisch angefärbt. Um exzitatorische Synapsen anzufärben wurde ein Antikörper gegen VGLUT1 und für die inhibitorischen Synapsen ein Antikörper gegen VGAT verwendet. VGLUT1 ist ein Glutamattransporter, der die Aufnahme von Glutamat in die präsynaptischen Vesikel exzitatorischer Neurone ermöglicht. VGAT erfüllt die gleiche Aufgabe in inhibitorischen Neuronen und fungiert als Transporter für GABA in präsynaptische Vesikel. Beide Antikörper binden also an präsynaptische Vesikelproteine, d.h. die Antikörpersignale auf dem zu untersuchenden, transfizierten Neuron stammten nicht von ihm selbst, sondern waren die Präsynapsen von umgebenden und Kontakt aufnehmenden Neuronen. Das transfizierte Neuron stellte die postsynaptische Seite dar. Eine Synapse setzt eine funktionsfähige prä- und postsynaptische Seite voraus und kann sich im Fall, dass es an einer dieser Seiten zu „Fehlern“ kommt, nicht ausbilden. Da die Postsynapsen möglicherweise durch die mutierten Fusionsproteine verändert waren, konnte vermutet werden, dass die Gesamtanzahl an exzitatorischen und evtl. auch an inhibitorischen Synapsen verringert sein könnte.

Es wurden an primären und sekundären Dendriten jeweils die VGLUT1- und VGAT-positiven Signale ausgezählt. Dabei wurden alle Punkte gewertet, die auf oder im Fall von VGLUT1, in einem Abstand von maximal 1 μm um den Dendriten herum lagen.

3.7.1 Exzitatorische Synapsen

An primären Dendriten hatten G1527A bzw. 2497delG überexprimierende Neurone signifikant weniger VGLUT1-positive Synapsen als bei Neuronen, die die Kontrolle und SHANK3 überexprimierten (s. Abb. 17 A). Mit A5008T transfizierte Neurone zeigten tendenziell auch weniger VGLUT1-positive Synapsen als Neurone, die mit der Kontrolle oder SHANK3 transfiziert worden waren. An sekundären Dendriten hatten Neurone mit dem Kontroll-, SHANK3 und A5008T Fusionsprotein die meisten exzitatorischen Synapsen (s. Abb. 17 B) und wiesen

Ergebnisse

untereinander keine Unterschiede auf. Auch an den Sekundärdendriten hatten G1527A und 2497delG überexprimierende Neurone im Vergleich zu Neuronen, die die Kontrolle und SHANK3 überexprimierten signifikant weniger exzitatorische Synapsen.

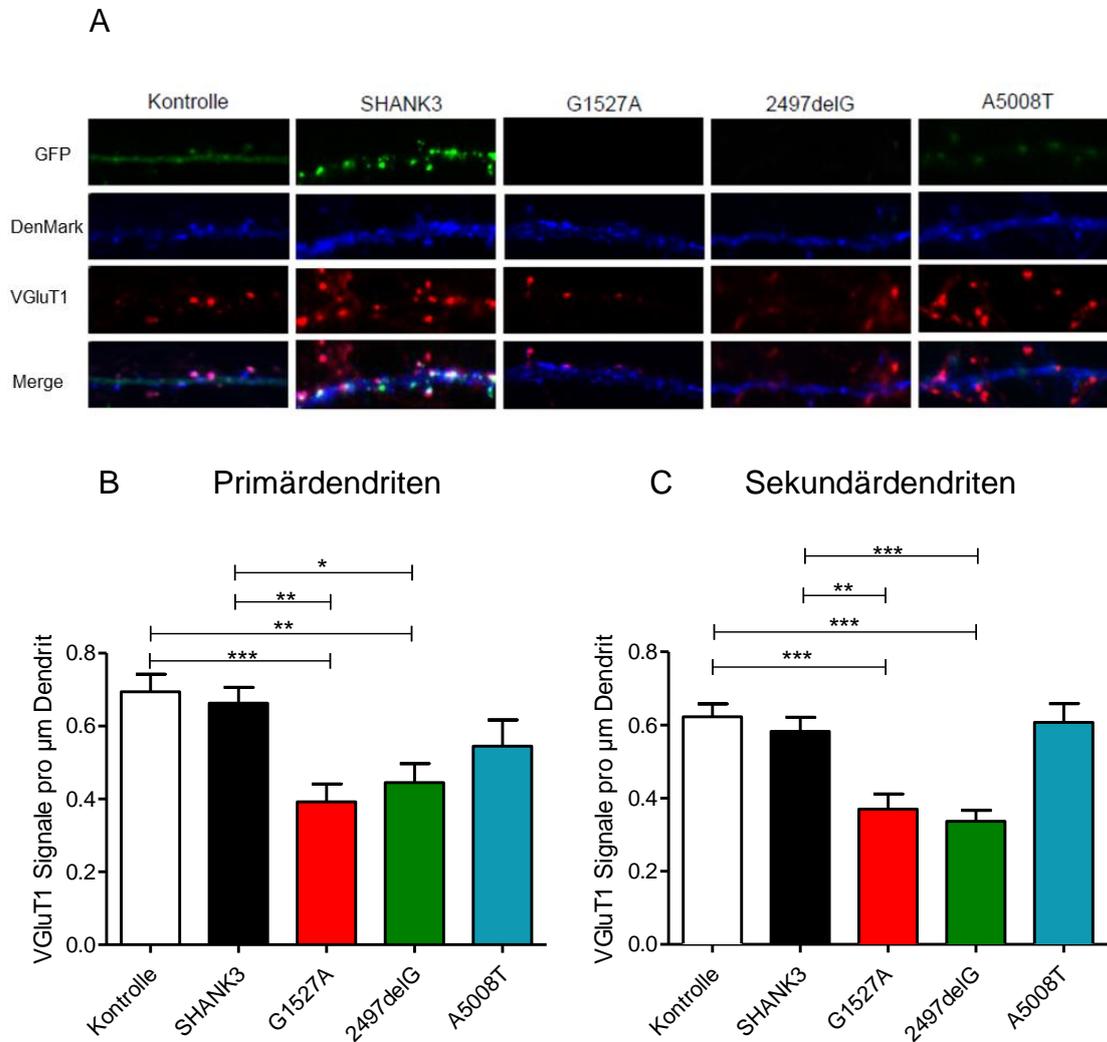


Abb. 17 A Repräsentative Dendritenausschnitte der mit den *SHANK3* Konstrukten und dem DenMark transfizierten hippocampalen Neurone. Exzitatorische Synapsen wurden mit dem präsynaptischen VGlut1-Antikörper angefärbt. GFP: Green fluorescent protein, Merge: Fusion aller Fluoreszenzkanäle. B Auszählung der VGlut1-positiven Signale an primären Dendriten. C Auszählung der VGlut1-positiven Signale an sekundären Dendriten. Für B und C gilt: Die Daten stammen von drei unabhängigen Experimenten. Pro Präparation wurden durchschnittlich sieben Neurone ausgewertet (n=21). Die Neurone mit dem A5008T Fusionsprotein entstammen nur in einer Präparation derselben Charge wie die anderen Bedingungen. Für die zweite Charge von A5008T wurde aber die Kontrolle mit ausgewertet (daher gilt für die Kontrolle: vier Experimente und n=31). Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

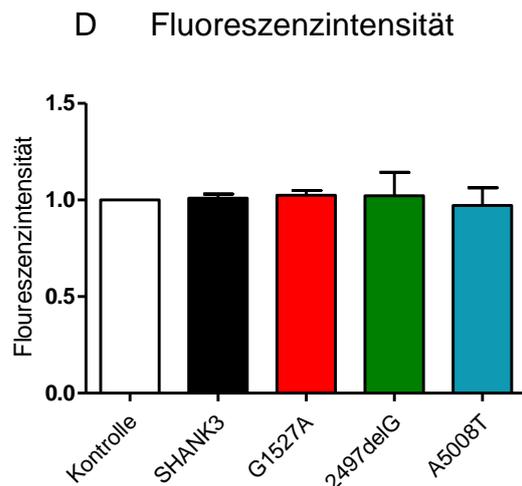


Abb. 17 D Auswertung der Fluoreszenzintensität der einzelnen VGluT1-Signale. Die Daten stammen von drei unabhängigen Experimenten. Pro Präparation wurden durchschnittlich sieben Neurone ausgewertet (n=21). Jede Charge (=Präparation) wurde auf die Kontrolle normiert und als Ratio dargestellt (n=3).

Bei der Messung der Fluoreszenzintensität der VGluT1-Cluster ergaben sich jedoch keine Unterschiede zwischen den Bedingungen (s. Abb. 17 D). Unterschiede in der Fluoreszenzintensität hätten auf eine verschieden starke Akkumulation von Antikörpern hingedeutet und damit für eine unterschiedliche Menge an präsynaptischen Vesikeln. Insofern ließ sich feststellen, dass es zwar weniger exzitatorische Synapsen bei G1527A und 2497delG überexprimierenden Neuronen gab, die verbliebenen aber nicht weniger exzitatorische Vesikel enthielten.

3.7.2 Untersuchung der synaptischen Lokalisation der GFP-positiven Cluster anhand der Kolo-kalisation mit VGluT1

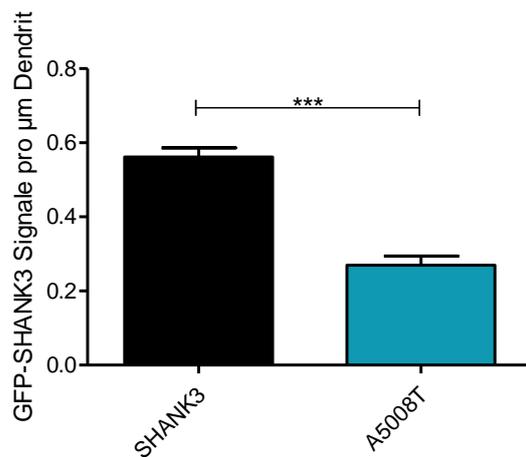
Die bisherigen Ergebnissen warfen die Frage auf, ob es überhaupt einen morphologischen Unterschied zwischen Neuronen gab, die mit den A5008T und SHANK3 Konstrukten transfiziert worden waren. Ausgehend von der Anzahl der VGluT1-positiven Synapsen pro Dendritenlänge gab es keinen Unterschied.

Von allen Fusionsproteinen bildeten nur SHANK3 und A5008T Cluster. Der Unterschied bestand in einer signifikant höheren Anzahl GFP-positiver Cluster bei SHANK3 Überexpression im Vergleich zur A5008T Überexpression (s. Abb. 18 A). Anhand der Kolo-kalisation mit VGluT1-Signalen konnte man abschätzen, ob die Proteincluster synaptisch oder eher dendritisch lokalisierten. Auch hierbei ließ sich

Ergebnisse

ein signifikanter Unterschied erkennen. SHANK3 befand sich zu 67% in den Synapsen, A5008T nur zu 53% (s. Abb. 18 B). Diese Analyse war für G1527A und 2497delG hinfällig, weil sie nicht außerhalb des Zellkerns vorkamen (siehe Lokalisationstudien 3.4).

A Dichte der SHANK3 Cluster an Sekundärdendriten



B Kolokalisation von GFP- und VGluT1-Signalen

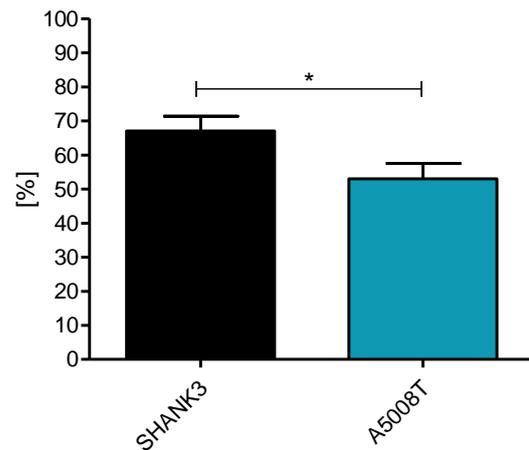


Abb. 18 A Dichte der GFP-positiven (GFP: Green fluorescent protein) SHANK3 Cluster an sekundären Dendriten. B Kolokalisation der SHANK3 Signale mit VGluT1-positiven Signalen an Sekundärdendriten. Für A und B gilt: Die ausgewerteten Neurone stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Präparation wurden sieben Neurone ausgewertet und pro Neuron vier Sekundärdendriten (n=21). Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

3.7.3 Inhibitorische Synapsen

Bezüglich der Anzahl inhibitorischer Synapsen bestand sowohl an primären als auch an sekundären Dendriten kein signifikanter Unterschied zwischen den fünf Bedingungen (s. Abb. 19 B und C). Daraus ließ sich ableiten, dass SHANK3 für die Ausbildung exzitatorischer Synapsen wichtiger ist als für die Ausbildung inhibitorischer Synapsen.

Als Konsequenz ließ sich für Neurone mit G1527A und 2497delG Überexpression zusammenfassen: Das Verhältnis von exzitatorischen zu inhibitorischen Synapsen war verändert. Bei „gesunder/normaler“ Anzahl an inhibitorischen Synapsen gab es eine geringere Anzahl exzitatorischer Synapsen und damit überwogen verhältnismäßig die inhibitorischen Eingänge in das mutierte Neuron. Da keine

Ergebnisse

elektrophysiologischen Untersuchungen in dieser Arbeit durchgeführt wurden, ließen sich die Ergebnisse auf funktioneller Ebene nicht weiter evaluieren.

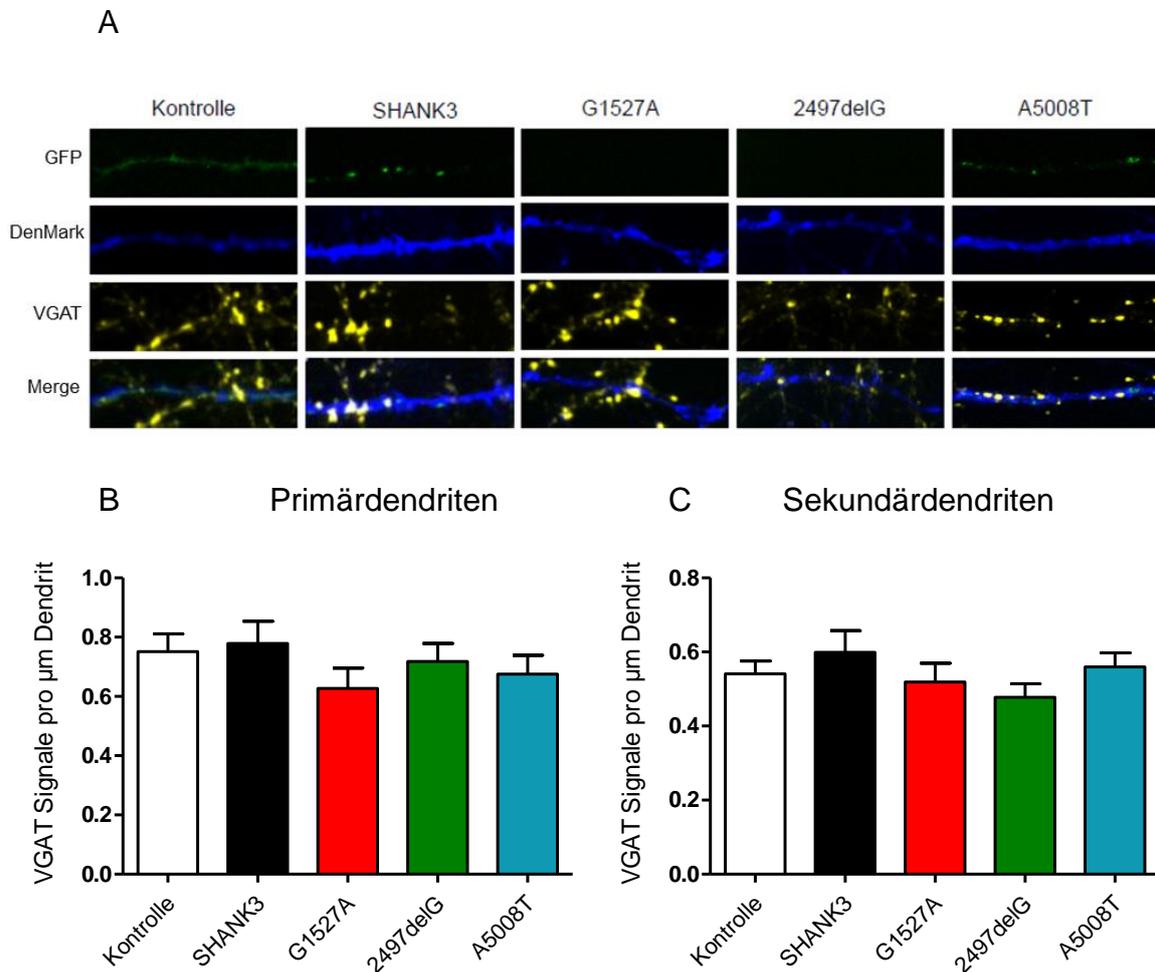


Abb.19 A Repräsentative Dendritenausschnitte der mit den *SHANK3* Konstrukten und dem DenMark transfizierten hippocampalen Neurone. Inhibitorische Synapsen wurden mit dem präsynaptischen VGAT-Antikörper angefärbt. GFP: Green fluorescent protein, Merge: Fusion aller Fluoreszenzkanäle. B Auszählung der VGAT-positiven Signale an primären Dendriten. C Auszählung der VGAT-positiven Signale an sekundären Dendriten. Für B und C gilt: Die Daten stammen von drei unabhängigen Präparationen und pro Präparation wurden jeweils vier Dendriten von jeweils sieben bis acht Neuronen ausgewertet (n=22). Das Original ist unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0 erschienen (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). [22]

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Promotion fanden Eingang in die Publikation „Cochoy DM, Kolevzon A, Kajiwara Y, Schoen M, Pascual-Lucas M, Lurie S, Buxbaum JD, Boeckers TM, Schmeisser MJ: **Phenotypic and functional analysis of *SHANK3* stop mutations identified in individuals with ASD and/or ID.** Mol Autism 6: 23 (2015)“. Somit werden einige Diskussionspunkte sowohl in dieser Promotionsschrift als auch in wesentlich kürzerer Form in der Publikation erwähnt werden. Absätze mit ähnlichen Inhalten sind am Ende mit „[22]“ gekennzeichnet. Unter dieser Ziffer ist die Publikation im Literaturverzeichnis aufgelistet.

In dieser Promotionsarbeit wurden drei neu aufgetretene Stopp-Mutationen im humanen *SHANK3* Gen charakterisiert, die bei Patienten mit ASS und geistiger Behinderung entdeckt wurden.

Jeder der drei Patienten ist schwer geistig und z.T. auch körperlich behindert und kaum in der Lage, mit anderen Menschen zu kommunizieren. Im Vergleich der geistigen und kommunikativen Fähigkeiten fielen leichte Unterschiede zwischen den Patienten auf. Patient 1 (G1527A) kommuniziert über eine Zeichensprache, Patient 2 (2497delG) spricht wenige selbst erfundene Wörter und Patient 3 (A5008T) kann einige Wörter lesen und sich mithilfe des PECS (Picture Exchange Communication System) verständigen. Patient 1 gilt als überwiegend gut gelaunt, zeigt hyperaktives Verhalten und hat als einziger der drei Patienten keine epileptischen Anfälle. Die Patienten 2 und 3 leiden beide unter Epilepsie und reagieren aggressiv bei Verunsicherung oder auf Änderungen in der täglichen Routine. Alle drei Patienten entwickelten ausgeprägte repetitive Verhaltensweisen. Während die Patienten 2 und 3 unter stärkeren körperlichen bzw. motorischen Einschränkungen leiden als Patient 1, weist Letzterer die meisten Dysmorphien auf. Wie anfänglich bereits erwähnt, könnten die Symptome des Patienten 1 auch auf die zusätzlich gefundene 17q12 Mikroduplikation zurückzuführen sein, deren Symptome z.T. mit denen von ASS und den Komorbiditäten des PMS (Phelan-McDermid-Syndrom) zusammenfallen. Deswegen ist ein direkter Vergleich der drei Patienten an dieser Stelle nicht möglich. Es soll nur darauf verwiesen werden, dass alle drei Patienten eine Punktmutation in demselben Gen aufweisen und dennoch einen variablen Phänotyp zeigen. Alle drei Punktmutationen führen zu einem autistischen Krankheitsbild mit geistiger Behinderung, aber die zusätzlichen

Symptome und Ausprägungsgrade der Symptome weisen eine hohe Variabilität auf. Wie ist diese klinische Variabilität bei Mutationen in demselben Gen zu erklären? Einen ersten Anhaltspunkt könnten die unterschiedlichen Mutationsstellen im Gen darstellen. Diese Arbeit gründet sich auf die Identifikation von drei Stopp-Mutationen in *SHANK3*, die zu unterschiedlich langen Restproteinen führen. Damit fehlen der SHANK3a Isoform, je nach Mutation, unterschiedlich lange C-terminale Anteile, deren Proteindomänen in der gesunden Zelle bestimmte Funktionen übernehmen.

Die Auswirkungen der fehlenden Proteindomänen wurden in dieser Arbeit auf morphologischer Ebene untersucht. Die Überexpression rekombinanter Proteine zeigte, dass die beiden kurzen Stopp-Mutationen G1527A und 2497delG zu einem ähnlichen morphologischen Phänotyp führten und sich damit grundsätzlich von A5008T und SHANK3 (es wird synonym für die SHANK3a Isoform verwendet) unterscheiden. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass Mutationen an verschiedenen Stellen in *SHANK3* zu verschiedenen morphologischen Phänotypen führen. Da SHANK3 ein Protein mit vielen funktionell unterschiedlichen Proteindomänen ist, scheint die Position der Mutation und das Fehlen einzelner Proteindomänen ein wichtiger Auslöser für die unterschiedlichen morphologischen und vermutlich auch funktionellen Auswirkungen einer Punktmutation zu sein. [22]

4.1 Lokalisationsstudien

Wie zu Beginn der Western Blot Experimente gezeigt werden konnte, ließen sich HEK293T-Zellen mit den synthetischen Konstrukten der drei Punktmutationen transfizieren. *In vivo* wurden die Abbruchproteine G1527A, 2497delG und A5008T, sowie das gesamte SHANK3 exprimiert. In HEK293T-Zellen lokalisierten diese Abbruchproteine überwiegend ins nukleäre Kompartiment, wohingegen sich SHANK3 vor allem in intrazellulären Clustern sowie in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und der Zellmembran verteilte. Während die clusterförmige Verteilung für Shank3a R.n. von Durand et al. (2011) in COS7-Zellen und von Quitsch et al. (2005) in HEK-Zellen bereits beobachtet wurde, konnte dieselbe Verteilung erstmals für menschliches SHANK3a gezeigt werden.

Diskussion

Die nukleäre Akkumulation von SHANK3 Abbruchproteinen wurde in HEK-Zellen bisher noch nicht beschrieben. Eine ähnliche Beobachtung konnte aber durch Grabrucker et al. (2013) in NIH-Zellen gemacht werden. Nach der Applikation von Leptomycin B, einem nukleären Exportinhibitor, war die nukleäre Fraktion mit endogenem und rekombinantem Shank3 angereichert, was auf eine zumindest temporäre Lokalisation von Shank3 im Zellkern hindeutete. [22]

Um biochemisch zu untersuchen, ob und welche der hier untersuchten SHANK3 Proteine in den Nukleus wandern, wurden aus Zelllysaten transfizierter HEK-Zellen nukleäre Fraktionen hergestellt und diese per Western Blot qualitativ analysiert. Alle vier SHANK3 Proteinvarianten konnten in der nukleären Fraktion detektiert werden, aber in unterschiedlicher Bandenstärke bzw. Konzentration. Trotz der gleichen geladenen Proteinmenge waren die Banden von G1527A und 2497delG signalintensiver als die von SHANK3 und A5008T. Kürzere Proteine lassen sich leichter transfizieren und G1527A und 2497delG könnten aufgrund der höheren Transfektionsrate eine stärkere Expression aufweisen. Der visuelle Eindruck der HEK-Zellbilder konnte insofern bestätigt werden, dass alle Fusionsproteine im nukleären Kompartiment nachgewiesen werden konnten. Da in NIH-Zellen endogenes [35] und, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, auch rekombinantes SHANK3 in den Nukleus wandern konnte, muss die nukleäre Lokalisation von SHANK3 Proteinen zu einem gewissen Grad eine physiologische Funktion haben. Es ist aber davon auszugehen, dass die extensive Akkumulation der mutierten SHANK3 Proteine eine pathologische Situation darstellt, deren morphologische Auswirkungen in HEK-Zellen noch nicht offensichtlich wurden. [22]

In Neuronen waren die Auswirkungen der Mutationen deutlicher zu erkennen und die Lokalisation der Fusionsproteine stellte sich ähnlich wie in HEK-Zellen dar. Wie u.a. von Böckers et al. (2005) und Durand et al. (2011) für Shank3 aus *Rattus norvegicus* beschrieben, verteilte sich auch SHANK3 aus *Homo sapiens* in Clustern entlang der Dendriten und überwiegend in Spines und an Synapsen. Die kurzen Fusionsproteine lokalisierten nach Betrachtung zahlreicher transfizierter Neurone ausschließlich im Zellkern. A5008T befand sich sowohl im Zellsoma als auch in den Dendriten und an exzitatorischen Synapsen. Dass es Unterschiede zwischen SHANK3 und A5008T in der dendritischen und synaptischen Verteilung

gab, konnte im direkten Vergleich durch die Auswertung überlappender GFP- und VGluT1-Signale, also der Kolo-kalisation des GFP-getaggtten Fusionsproteins und des präsynaptischen Markers VGluT1, gezeigt werden. Im Vergleich zu SHANK3 bildete A5008T nur halb so viele dendritische Cluster und wurde in signifikant geringerem Ausmaß synaptisch exprimiert. Auch wenn A5008T als einziges der drei untersuchten Abbruchproteine im somatodendritischen Kompartiment lokalisierte, war seine synaptische Lokalisation doch nicht in dem Maße ausgeprägt wie bei SHANK3. A5008T muss daher eine mutationsabhängige Einschränkung im zellulären Transport zur Synapse aufweisen. Böckers et al. (2005) identifizierten einen bestimmten Abschnitt im C-Terminus von Shank3 als essentiellen Bestandteil, um das Protein zur Synapse transportieren zu können. In Grabrucker et al. (2011) wurde zu der C-terminalen Transportregion zusätzlich noch die Homer-binding-site gezählt und der gesamte Komplex als „Synaptic targeting/assembly“ bezeichnet. Die N-terminale Region ist in allen hier untersuchten SHANK3 Abbruchproteinen unverändert, aber am C-terminalen Ende fehlen je nach Mutation unterschiedlich große Abschnitte. G1527A fehlt die SAM-Domäne, die Homer-binding-site und die PDZ-Domäne. 2497delG fehlt ebenfalls die SAM-Domäne und die Homer-binding-site und A5008T fehlt nur die SAM-Domäne bis auf ihre drei ersten Aminosäuren. Mit dem Wissen um die Bedeutung der C-terminalen Region ist es verständlich, warum die kurzen Abbruchproteine gar nicht und die A5008T Mutation nur z.T. synaptisch lokalisieren. Auch Durand et al. (2011) und Arons et al. (2012) konnten für eine weitere C-terminale Stopp-Mutation in Shank3 namens „InsG“ zeigen, dass das dazugehörige Protein nicht mehr an die Synapse transportiert werden konnte und sich gleichmäßig im Zellkörper und in den Dendriten verteilte. Interessanterweise führt die *Shank2* Stopp-Mutation R462X, 2011 von Berkel et al. charakterisiert, zu einer ähnlich gleichmäßigen Verteilung wie InsG, ohne die für SHANK2 typischen Cluster bilden zu können. [22]

Erstmals konnte in dieser Arbeit eine ausschließlich nukleäre Lokalisation von Fusionsproteinen Autismus assoziierter *SHANK3* Mutationen nachgewiesen werden. Grabrucker et al. (2013) erbrachten diesen Nachweis kürzlich für die Stopp-Mutation *Shank3* R1119X, die 2010 von Gauthier et al. bei einem schizophrenen Patienten entdeckt wurde. Während gezeigt werden konnte, dass Shank3 in primären hippocampalen Neuronen unter physiologischen Bedingungen

in den Zellkern wandern kann und diesen aktivitätsabhängig wieder verlässt, blieb die R1119X Mutation dauerhaft im Nukleus. Grabrucker et al. (2013) lieferten interessante Hinweise für eine mögliche Funktion von Shank3 im Nukleus. So scheint Shank3 nicht nur in der PSD mit einer Vielzahl an Proteinen zu interagieren, sondern verfügt über eine ebenfalls große Interaktionsbreite im Zellkern. Zu den häufigsten Bindungspartnern zählen hnRNPs (multiple heterogeneous nuclear ribonucleoproteins), die Shank3 mit der DNA verbinden könnten. Indirekt nimmt Shank3 dabei höchstwahrscheinlich auf die Transkription von 57 Genen Einfluss, darunter viele, die in Synaptogenese und neuronale Plastizität involviert sind. Ein wichtiges Merkmal des „Synpto-nukleären-Shuttlings“ ist in diesem Zusammenhang die Abhängigkeit vom Aktivitätszustand des Neurons. Shank3 ist in der Lage, innerhalb kürzester Zeit seine nukleäre Position einzunehmen oder den Nukleus wieder zu verlassen, je nach den Anforderungen der zellulären Umgebung. Die Fusionsproteine R1119X, G1527A und 2497delG befinden sich dagegen unabhängig von der zellulären Aktivität dauerhaft im Zellkern. In transfizierten NIH-Zellen untersuchten Grabrucker et al. (2013) die Expressionslevel Shank3 abhängiger Gene während eines kompletten Shank3 Knockdowns. Bei Neuronen, die mit R1119X transfiziert worden waren, konnte ein ähnlicher Effekt auf die Shank3 abhängige Genexpression wie unter Shank3 Knockdown-Bedingungen nachgewiesen werden. Insofern ist anzunehmen, dass die Akkumulation und dauerhafte Präsenz von mutierten Shank3 Proteinen, ähnlich wie der Verlust von Shank3, zu einer veränderten Expression neuronaler Gene führt.

Die endogenen Shank3 Level waren nicht nur nach dem Knockdown „ausgeschaltet“, sondern auch unter Überexpression von R1119X erniedrigt, was darauf hindeutet, dass die Mutation nicht nur die Expression anderer Gene beeinflusst, sondern auch die Expression oder Translation der gesunden Shank3 Allele in der transfizierten Zelle inhibiert und damit die Pathologie möglicherweise noch verstärkt.

Aufgrund der geringen Transfektionsrate in Neuronen war es nicht möglich, subzelluläre Fraktionen herzustellen und mithilfe des Western Blots den Proteingehalt der neuronalen nukleären Fraktionen zu bestimmen. Nach den Ergebnissen aus den HEK-Zell-Versuchen und den Experimenten, die Grabrucker

et al. (2013) durchgeführt haben, wird mit großer Wahrscheinlichkeit die ausschließlich nukleäre Lokalisation von G1527A und 2497delG in hippocampalen Neuronen angenommen. Auch für A5008T ist eine partielle nukleäre Lokalisation wahrscheinlich. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die pathologischen Auswirkungen von G1527A, 2497delG und A5008T z.T. durch die nukleäre /partiell nukleäre Lokalisation und eine Veränderung der neuronalen Genexpression verursacht sein könnten.

4.2 Veränderungen der Neuronenmorphologie

Die Morphologie der transfizierten Neurone wurde anhand der Komplexität des Dendritenbaums, der Anzahl und Länge der Primärdendriten und des Nucleusumfangs erfasst. Die mikroskopischen Aufnahmen, die für die Lokalisationsstudie angefertigt wurden, ließen bereits vermuten, dass G1527A und 2497delG zu einem Umbau der Dendriten führen könnten, weil die Dendriten auf den ersten Blick kürzer und dünner als bei den Kontrollen erschienen. Die Sholl-Analyse konnte diesen Eindruck bestätigen. Ergebnis waren signifikant weniger komplexe Dendritenbäume nach Überexpression von G1527A und 2497delG im Vergleich zur Überexpression der Kontrolle, A5008T und SHANK3. Neurone, die mit der Kontrolle und A5008T transfiziert worden waren, wiesen in der Tat etwas komplexere Dendritenbäume auf als der Wildtyp. [22]

Grabrucker et al. (2013) zeigten nach Überexpression von R1119X eine signifikante Abnahme der Komplexität des Dendritenbaums verglichen mit der Kontrolle. Im Vergleich zu Shank3 war die Komplexität des Dendritenbaums von R1119X überexprimierenden Neuronen nicht signifikant verringert. *In vivo* wurde von Peça et al. (2011) in einer *Shank3* Mausmutante, der die meisten Isoformen von Shank3 fehlten, ein gegenteiliger Effekt beobachtet, nämlich eine „neuronale Hypertrophie“ mit längeren und stärker verzweigten Neuronen. Im Gegensatz zu der in Grabrucker et al. (2013) und dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Analyse exzitatorischer, hippocampaler Neurone, wurden von Peça et al. *in vivo* inhibitorische striatale Neurone (Medium spiny neurons bzw. MSNs) analysiert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Effekte eines *SHANK3* Verlustes oder von *SHANK3* Mutationen hirnrregionspezifisch bzw. neuronpopulationsspezifisch

sind. Da sich *in vitro* Experimente kaum mit *in vivo* Experimenten vergleichen lassen, ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit also nur mit der Untersuchung der R1119X Mutation [35] gegeben. Daraus ergibt sich eine statistisch signifikante Reduktion der Verzweigung des Dendritenbaums von R1119X, G1527A und 2497delG überexprimierenden Neuronen. Alle drei Fusionsproteine weisen einen Verlust des C-terminalen Proteinendes bis in die Prolin-reiche Region auf. Der Verlust eines Teils der SAM-Domäne, wie bei A5008T, scheint einen gegenteiligen Effekt zu haben und zu einem distal etwas komplexeren Dendritenbaum im Vergleich zu SHANK3 überexprimierenden Neuronen zu führen.

Die Anzahl der Primärdendriten war in allen Bedingungen gleich. Veränderungen bezüglich der Dendritenzahlen scheinen also eher ein „Problem“ des distalen Dendritenbaums zu sein. Die Länge der Dendriten war jedoch bereits ab den primären Dendriten unterschiedlich. G1527A und 2497delG überexprimierende Neurone wiesen signifikant kürzere Primärdendriten auf als die anderen Bedingungen. [22]

Der Umfang des Zellkerns war trotz nukleärer Akkumulation von G1527A und 2497delG in allen Bedingungen gleich.

Parameter wie Dendritenlänge und die Ausmaße von Zellkernen wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben, weshalb keine Vergleichsdaten zur Verfügung stehen. In dieser Arbeit wurden diese Parameter berücksichtigt, um ein möglichst ganzheitliches Bild der morphologischen Veränderungen der transfizierten Neurone zu gewinnen. In Hinblick auf Primärdendritenlänge und Komplexität des Dendritenbaums lässt sich feststellen, dass Mutationen in *SHANK3* auch außerhalb seiner physiologischen Lokalisation, Synapse und Nukleus, zu morphologischen Alterationen führen. Dass das gesamte Neuron in seiner Form verändert ist, spricht für einen tiefgreifenden Einfluss der Mutationen in intrazelluläre Vorgänge. Ein möglicher Ansatzpunkt für diese Einflussnahme könnte das Aktinzytoskelett sein, das einerseits erwiesenermaßen mit *SHANK3* assoziiert ist und andererseits maßgeblich die Morphologie einer Zelle bestimmt. Es bleibt an dieser Stelle ungeklärt, wie der Verlust des C-terminalen Endes von *SHANK3* das Zytoskelett des gesamten Neurons variieren könnte.

4.3 Spinedichte und Spinemorphologie

Ein veränderter Spinebesatz der Dendriten ist ein morphologisches Korrelat neuropsychiatrischer Erkrankungen [64] und kann einen Hinweis auf funktionelle Alterationen mutierter Neurone liefern. Größenveränderungen der Spines sind physiologischerweise mit Prozessen der neuronalen Plastizität wie der Langzeitpotenzierung und der Langzeitdepression assoziiert. Im Hirngewebe autistischer Patienten konnte z.B. eine Zunahme der Spinedichte an den apikalen Dendriten pyramidaler Neurone des Kortex beobachtet werden [43]. Diese Beobachtung unterstützte die Hypothese, dass im Gehirn autistischer Patienten intraregionale Hyperkonnektivität sowie interregionale Hypokonnektivität bestehen könnte [64], d.h., dass Neurone vor allem in ihrem unmittelbaren Umfeld enger als im gesunden Gehirn synaptisch miteinander verbunden sind, aber integrative Funktionen über mehrere Hirnregionen hinweg eingeschränkt sind.

Es gibt unterschiedliche Hypothesen zur Spineentstehung und der physiologischen Rolle der Filopodien. Es werden sowohl extrinsische Mechanismen diskutiert, die über das aussprossende Axon an einem Dendriten Spines induzieren können (das Miller/Peters Modell), als auch intrinsische, bei denen Spines heranwachsen und erst sekundär Kontakt zu einem Axon finden (das Filopodienmodell und das Soleto Modell) [82]. Forschungsergebnisse unterstützen beide Modelle, sodass entweder von einer verschiedenartigen Spinogenese ausgegangen werden muss oder beide Mechanismen zusammenwirken. Filopodien werden definitionsgemäß nicht zu den Spines gezählt und die bisher einzige plausible Erklärung für ihre Funktion liefert das Filopodienmodell (s.u.).

Bei Ratten beginnt die Spineentwicklung innerhalb der ersten postnatalen Lebenswoche, noch bevor sich die Augen öffnen. Die Tatsache, dass Spines in Gehirnregionen entstehen, die zu diesem Zeitpunkt noch keine sensorischen Informationen erhalten, wie beispielsweise die primäre Sehrinde, unterstützt die Hypothese der intrinsischen Faktoren der Spinogenese. Ausgehend vom Filopodienmodell entsprossen zu diesem Zeitpunkt die ersten Filopodien vom Dendritenschaft und nehmen Kontakt zu naheliegenden Axonen auf. Sobald sich Filopodium und Axon einander angenähert haben, bilden sich synaptische Strukturen aus und das Filopodium wandelt sich zum kürzeren Spine mit deutlich

ausgeprägtem Hals und Köpfchen um. Ausgehend von diesem Modell können Filopodien als Vorläufer der Spines angesehen werden, die umgebende Axone „einfangen“ [82].

Wie eingangs bereits beschrieben, scheint SHANK3 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Spines zu spielen. Roussignol (2005) zeigte, dass allein die Überexpression von Shank3 in einer Neuronenpopulation, die normalerweise keine Spines ausbildet, zur Entstehung von Spines (75%) und Filopodien (25%) führen kann. Aus Experimenten mit mutierten Shank3 Varianten konnte Roussignol ableiten, dass vor allem die Interaktion mit Cortactin, das C-terminal an Shank3 bindet und eine Verbindung zu Aktin herstellt, essentiell für die Spinebildung ist. Ebenfalls C-terminal lokalisiert Abp1, ein F-Aktin bindendes Protein, für das Haeckel et al. (2008) nachweisen konnte, in Spinebildung und -reifung involviert zu sein. Zusammengefasst lassen diese Publikationen den Schluss zu, dass Shank3 indirekt über die C-terminal gebundenen Proteine Cortactin und Abp1 das Aktinzytoskelett in der Postsynapse und damit im Spine organisiert. Die Organisation und Modulation des Zytoskeletts ist der entscheidende Vorgang bei der Bildung und dem Umbau von Spines.

G1527A und 2497delG überexprimierende Neurone wiesen signifikant weniger Spines auf als Neurone, die mit der Kontrolle, *SHANK3* und A5008T transfiziert worden waren. Unter den zuletzt genannten Bedingungen bestanden keine signifikanten Unterschiede. *SHANK3* überexprimierende Neurone zeigten nicht nur die meisten Spines, sondern auch die meisten Filopodien und hatten damit insgesamt die meisten Fortsätze an ihren Dendriten. Die Filopodien waren darüber hinaus signifikant kürzer als bei Neuronen, die die anderen Fusionsproteine überexprimierten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Verhältnis von Spines zu Filopodien bei Transfektion mit der Kontrolle, *SHANK3* und am stärksten mit A5008T zugunsten der Spines ausfiel. G1527A sowie 2497delG überexprimierende Neurone wiesen etwa zu gleichen Anteilen Spines und Filopodien oder z.T. mehr Filopodien als Spines auf. Damit führten die kurzen Mutationen zu einem nahezu gegenteiligen Spines/Filopodien-Verhältnis als die anderen Bedingungen. [22]

In der Literatur bestehen bisher wenige Vergleichsmöglichkeiten für die Ergebnisse der Spineanalyse. Durand et al. (2011) kamen zu ähnlichen

Ergebnissen für die *Shank3* Stopp-Mutation InsG (das Protein endet in der Prolinreichen Region) und zu leicht abweichenden Ergebnissen für *Shank3*. Im Vergleich zur Kontrolle war *Shank3* in dieser Studie in der Lage, die Spinedichte signifikant zu erhöhen und die Filopodienanzahl zu verringern. Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, wobei das genaue Vorgehen während der Auswertung und die Definitionen von Filopodien und Spines von Durand nicht näher beschrieben wurde. Dendritische Fortsätze wurden möglicherweise anders klassifiziert. Leichte Unterschiede in den zellulären Eigenschaften der hier untersuchten Konstrukte mit den humanen Sequenzen und der von Durand verwendeten Konstrukte mit den Sequenzen aus *Rattus norvegicus* sind darüber hinaus nicht auszuschließen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit zeigte Durand, dass eine C-terminale Stopp-Mutation in *Shank3* (InsG) zu einer signifikanten Abnahme der Spinedichte führt. Diese Arbeit ergänzt die bisher publizierten Ergebnisse von *Shank3* Mutationen um zwei weitere Mutationen. So konnte bis heute für drei Stopp-Mutationen in *Shank3/SHANK3*, InsG, G1527A und 2497delG, ein negativer Effekt auf die Spineinduktion nachgewiesen werden. Gemeinsam ist diesen Mutationen, dass sie zu einem Verlust des C-terminalen Endes ab der Prolinreichen Region bzw. der SH3-Domäne führen. Das partielle Fehlen der SAM-Domäne wie bei A5008T scheint sich nicht negativ auf die Spinedichte auszuwirken, sondern verringert die Anzahl der Filopodien. Die für die Spineinduktion entscheidende Proteindomäne muss sich also zwischen der SH3-Domäne und der SAM-Domäne befinden. Am ehesten infrage kommen die Bindungsstellen für Cortactin und Abp1, die SHANK3 mit dem Aktinzytoskelett verbinden. Durand et al. (2011) konnten in pilzförmigen, reifen Spines erhöhte F-Aktin-Level nachweisen und schlossen auf einen Aktin-abhängigen Mechanismus von SHANK3, die Spinebildung zu beeinflussen. SHANK3 wird als Koordinator der postsynaptischen Proteine in Spines postuliert und ist über eine direkte Änderung des F-Aktin-Gehalts in der Lage, die Spineform und -funktion zu ändern [26].

Im Gegensatz zu A5008T, das nach Überexpression sogar zu einem noch höheren Spine/Filopodien-Verhältnis als SHANK3 führt, fehlt dem G1527A und dem 2497delG Fusionsprotein wahrscheinlich die Möglichkeit durch Modifikationen des Aktinzytoskeletts Spines auszubilden und umzubauen. So lassen sich nach deren Überexpression verhältnismäßig viele dünne, unreife

Fortsätze und wenig ausgereifte Spines finden. Es bleibt an dieser Stelle ungeklärt, wie die *in vivo* Situation in einem von einer solchen Mutation betroffenen Gehirn aussehen könnte. Wie eingangs erwähnt, wurde im Gehirn von autistischen Patienten eine vermehrte Spinedichte festgestellt, was im Widerspruch zu den Ergebnissen aus der Zellkultur steht. Da ASS aber durch zahlreiche Faktoren bedingt sein können, ist es wahrscheinlich, dass sich ASS auf unterschiedliche Weise im Hirngewebe abbilden können. Penzes et al. (2011) beschrieb ganz allgemein für autistische Patienten eine Zunahme der Spines und ging nicht weiter auf die Ursachen der ASS ein. Die *in vivo* Neuronenmorphologie von ASS-Patienten mit *SHANK3* Mutation wurde bisher noch nicht untersucht. [22]

4.4 Exzitatorische und inhibitorische Synapsen

In einem ausgewachsenen Gehirn enthält nahezu jeder Spine eine exzitatorische Synapse [82]. Auch wenn die Situation im Gehirn keinesfalls mit Kulturbedingungen gleichzusetzen ist und in dieser Arbeit heranwachsende statt reife Neurone untersucht wurden, ist ein Zusammenhang zwischen der Spinedichte bzw. Spineform und der Anzahl an Synapsen anzunehmen. Mithilfe des präsynaptischen Markers VGluT1 wurden exzitatorische Synapsen immunzytochemisch angefärbt und an primären und sekundären Dendriten manuell ausgezählt. Sowohl an primären als auch an sekundären Dendriten wiesen G1527A und 2497delG überexprimierende Neurone signifikant weniger exzitatorische Synapsen auf als Neurone, die mit der Kontrolle und *SHANK3* transfiziert worden waren. [22]

Die von Durand et al. (2011) und Arons et al. (2012) durchgeführte Überexpression des Abbruchproteins InsG führte ebenso wie bei G1527A und 2497delG zu einer Abnahme der VGluT1-positiven Signale [2]. Dasselbe Ergebnis wurde für die *Shank3* R1119X Mutation von Grabrucker et al. (2013) beschrieben. Damit sind nun mindestens vier *SHANK3* Stopp-Mutationen bekannt, deren Proteine die Anzahl exzitatorischer Synapsen an hippocampalen Neuronen verringern, sodass von einem eindeutigen und konvergierenden Effekt C-terminaler Stopp-Mutationen auf diesen Parameter ausgegangen werden kann. Vermittelt wird dieser Effekt vermutlich über die Abnahme der Spines, die

wiederum direkt mit der SHANK3 abhängigen Modulation des Aktinzytoskeletts in Verbindung steht.

Inhibitorische Synapsen befinden sich nicht an Spines, sondern direkt am Dendritenschaft. Die inhibitorische Postsynapse ist grundsätzlich anders aufgebaut als die exzitatorische und enthält nach bisherigem Kenntnisstand kein SHANK Protein. Die wichtigsten Neurotransmitterrezeptoren sind der GABA_A- und der Glycinrezeptor, die durch das Gerüstprotein Gephyrin in der inhibitorischen Postsynapse verankert sind [70]. Obwohl SHANK3 nicht in einem direkten Zusammenhang mit inhibitorischen Synapsen steht, wurden sie in dieser Arbeit analysiert, um eventuelle indirekte Auswirkungen der Stopp-Mutationen zu untersuchen.

Sowohl an primären als auch an sekundären Dendriten traten keine Unterschiede in der Anzahl inhibitorischer Synapsen zwischen den Bedingungen auf. Damit konnte gezeigt werden, dass *SHANK3* Mutationen keine indirekten Einflüsse auf die Morphologie inhibitorischer synaptischer Kontakte ausüben. Aufgrund der unveränderten Anzahl inhibitorischer und einer verminderten Anzahl exzitatorischer Synapsen war das Verhältnis von erregenden und hemmenden Eingängen im jeweiligen Neuron vermutlich verändert. Die hemmenden Synapsen überwiegen bei Überexpression von G1527A und 2497delG. Bei R1119X überexprimierenden Neuronen konnten Grabrucker et al. (2013) morphologisch ebenfalls eine E/I-Imbalance (exzitatorische/inhibitorische Imbalance) zugunsten der Inhibition vermuten, die gleichfalls durch eine verringerte Anzahl exzitatorischer bei einer unveränderten Anzahl inhibitorischer Synapsen verursacht wurde. [22]

E/I-Imbalancen werden als eine der Hauptursachen für ASS angesehen. Eine Veränderung von Erregung und Hemmung im Gehirn wird außerdem mit der Entwicklung von Epilepsie in Verbindung gebracht, die auch bei den Patienten mit der 2497delG bzw. der A5008T Mutation vorhanden ist. Da allein aus den Zellkulturexperimenten keine E/I-Imbalance von A5008T überexprimierenden Neuronen zu erwarten wäre, müssen noch andere Faktoren bei der Entstehung der Epilepsie im entsprechenden Patienten eine Rolle spielen. Ob in den Gehirnen der drei Patienten tatsächlich eine E/I-Imbalance vorliegt, ist anhand der Zellkulturexperimente nicht festzustellen. Noch weniger lässt sich sagen, ob eine

mögliche E/I-Imbalance für den autistischen Phänotyp der drei Patienten verantwortlich ist. Diese Fragen könnten in Zukunft in komplexeren Modellen wie iP5-Zellkulturen aus den Patienten oder Tiermodellen geklärt werden. Einen interessanten Nachweis für eine durch Shank3 verursachte E/I-Imbalance *in vivo* gibt das Shank3-Überexpressions-Mausmodell, das 2013 von Han et al. charakterisiert wurde. In diesem Modell ist Shank3 1,2 bis 2-mal mehr als in unveränderten Organismen vorhanden und unterscheidet sich von den bisherigen Kultur- und Mausmodellen, in denen gesundes Shank3 vermindert ist. Wie erwartet, zeigten sich z.T. gegenteilige Effekte im Vergleich zu bisherigen Modellen, darunter eine E/I-Imbalance, die zu einer verstärkten exzitatorischen und einer abgeschwächten inhibitorischen Transmission führte. Es gibt also erste Hinweise aus *in vivo* Experimenten, dass SHANK3 Level die E/I-Balance signifikant beeinflussen.

4.5 Hypothesen zu Auswirkungen der Stopp-Mutationen

Auch wenn dieser Arbeit das humane Genmaterial dreier Patienten zugrunde liegt, kann auf der Grundlage der bisher durchgeführten Experimente kein direkter Bezug zu den Symptomen der Patienten hergestellt werden. Zum einen kann die Symptomatik des 1. Patienten (G1527A) nicht ausschließlich auf seine *SHANK3* Mutation zurückgeführt werden, sondern könnte auch durch seinen „Second Hit“, die 17q12 Mikroduplikation, mitbeeinflusst werden. Zum anderen ist die Zellkultur ein Modell, das zur orientierenden Erstuntersuchung zwar gut geeignet - mit der Situation *in vivo* aber nicht direkt zu vergleichen ist. Die Tatsache, dass der 3. Patient (A5008T) ähnlich schwer beeinträchtigt ist wie die beiden anderen Patienten, sich diese Mutation aber nach Überexpression des korrespondierenden Abbruchproteins in der Zellkultur morphologisch überwiegend wie das unveränderte *SHANK3* verhält zeigt, dass weitere Pathomechanismen von *SHANK3* Mutationen in Betracht gezogen werden müssen, um die morphologischen Beobachtungen zu vervollständigen. Eine mögliche Hypothese zur Auswirkung von *SHANK3* Mutationen wurde unter 4.1 bereits beschrieben. Da *SHANK3* indirekt die Transkription bestimmter Gene reguliert [35], könnten bereits auf Transkriptionsebene zelluläre Veränderungen stattfinden, die sich nicht zwingend in der Morphologie, aber evtl. in der Funktion auswirken. Veränderte

Proteinlevel in der PSD sind ein häufiges morphologisches und funktionelles Korrelat ASS assoziierter Mutationen [74] und können durch eine „Produktionsstörung“ auf Transkriptions- oder Translationsebene verursacht sein oder durch einen fehlerhaften Transport und eine mangelnde Stabilisierung in der Ziellokalisierung. Im Fall von *SHANK3* Mutationen sind beide Mechanismen möglich: Es kann durch den Verlust der Gerüstfunktion und der Stabilisierung der PSD-Proteine sowie durch eine veränderte Proteinexpression zu einer variierten Zusammensetzung der PSD kommen. Ob beide Mechanismen parallel wirken oder ob es von der Mutation abhängt, welcher sich stärker auswirkt, bleibt ungeklärt. [22]

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen für die G1527A und die 2497delG Mutation einen „Loss-of-function“ Effekt nahe. Die A5008T Mutation ist dieser Kategorie nicht eindeutig zuzuordnen. Auch in der Literatur sind bisher überwiegend Loss-of-function-Mutationen von *SHANK3* beschrieben worden, die z.T. ähnliche Auswirkungen zeigten, wie die G1527A und die 2497delG Mutation. Mameza et al. (2013) konnten für eine N-terminale Punktmutation (L68P) einen Gain-of-function Effekt über eine verstärkte Bindung zu Interaktionspartnern feststellen. Die Mutation befindet sich N-terminal in Bezug auf die Ankyrin-repeats und in einer Region, die als SHANK/ProSAP n-terminal-Domäne (SPN) benannt wurde. Diese Region bindet intramolekular an die Ankyrin-repeats und blockiert somit die Bindung der Interaktionspartner Alpha-fodrin und Sharpin [57]. Die Punktmutation hebt diese Blockade auf und lässt eine dauerhafte Bindung von Alpha-fodrin und Sharpin an SHANK3 zu. In Zellkulturexperimenten verhielt sich diese Mutation wie Shank3, verursacht aber bei dem Patienten, der diese Mutation trägt, autistische Symptome [57]. Ähnlich wie bei der A5008T Mutation scheinen Zellkulturexperimente und Symptome in keinem Zusammenhang zu stehen.

Für die hier untersuchten Mutationen sollten hypothetisch sowohl die bisher vermuteten Loss-of-function-Mechanismen in Betracht gezogen werden als auch Gain-of-function-Mechanismen, die durch Konformationsänderungen des Proteins aufgrund des fehlenden C-Terminus entstanden sein könnten und die durch bisherige Analysen nicht entdeckt werden konnten.

Eine erste Erklärung für das heterogene Krankheitsbild *SHANK3* assoziierter ASS lieferten Analysen von Wang et al. (2014). Sie untersuchten die sechs bekannten

Isoformen von Shank3 (a-f), die durch alternatives Splicen aus dem *Shank3* Gen entstehen, hinsichtlich ihrer Lokalisation im Gehirn und ihren spezifischen Funktionen. Jede Isoform besteht aus einer unterschiedlichen Kombination der fünf Hauptproteininteraktionsdomänen von SHANK3 (Ankyrin-repeats, SH3-Domäne, PDZ-Domäne, Prolin-reiche Region und die SAM-Domäne). In experimentellen Ansätzen wird die Isoform a als „Wildtyp-Shank3“ verwendet und wurde dadurch nicht zuletzt durch diese Arbeit charakterisiert. Die Isoform b ist eine im gesamten Gehirn selten vorkommende Isoform, die aus den Komponenten Ankyrin-repeats, SH3-Domäne und PDZ-Domäne besteht und damit bezüglich der Domänenanteile vergleichbar mit 2497delG ist. Während die Isoformen a,c,d,e und f im Zytosol und z.T. synaptisch lokalisieren, befindet sich die Isoform b überwiegend im Zellkern. Die Isoformen b und e waren im Gegensatz zu a und c nicht in der Lage, die Anzahl exzitatorischer Synapsen oder die Spinedichte zu erhöhen. Damit gleicht die Isoform b nicht nur in ihrer Lokalisation G1527A und 2497delG, sondern auch in ihrer Funktion. Hätte man also als Kontroll-SHANK3 die Isoform b anstatt von a gewählt, hätten vermutlich gleiche Ergebnisse für die Bedingungen G1527A und 2497delG versus SHANK3b resultiert. Wenn es aber physiologischerweise eine SHANK3 Variante gibt, die sich wie die kurzen Stopp-Mutationen verhält, wie kann es sich dann um eine pathologische Situation im Fall der Mutationen handeln? Das entscheidende Kriterium, ob ein SHANK3 Protein, dem die C-terminalen Anteile ab der PDZ-Domäne fehlen, physiologisch oder pathologisch ist, scheint die Menge des Proteins und das Verhältnis zu den anderen Isoformen zu sein. Folgendes lässt sich daraus ableiten: 1. SHANK3-Isoformen haben wohlmöglich unterschiedliche zelluläre Funktionen und werden sehr wahrscheinlich zelltypspezifisch und aktivitätsabhängig exprimiert [78]. 2. Mutationen in *SHANK3* können Splicestellen/Promotoren unterbrechen und damit die Bildung einiger Isoformen verhindern. 3. So erklärt sich die Pathogenität einer Mutation nicht allein durch das „fehlerhafte“ Protein, sondern auch durch den Verlust einiger Isoformen und insgesamt durch ein gestörtes Verhältnis der Isoformen zueinander. 4. Da abhängig von der Mutationsstelle im Genom verschiedene Splicestellen betroffen sein können und die Isoformzusammensetzung damit sehr unterschiedlich ausfallen kann, liefern diese neuen Erkenntnisse eine mögliche Erklärung für die Variabilität der klinischen Symptome der Patienten [78]. [22]

Ob diese Überlegungen zum Pathomechanismus von *SHANK3* Mutationen auf die Stopp-Mutationen dieser Arbeit übertragbar sind, lässt sich vermutlich kaum unter den künstlichen Transfektionsbedingungen der Zellkultur nachweisen. Ob es zu einem veränderten Gehalt und einer verschiedenen Zusammensetzung der Isoformen kommt, wäre eine interessante Fragestellung für Untersuchungen in iPS-Zellkulturen der drei Patienten. Die Ergebnisse von Wang et al. (2014) lieferten Ideen für eine neue Hypothese zur Pathogenese von *SHANK3* Mutationen, die durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht unbedingt bestätigt werden konnten, aber die die Variabilität der Patientensymptome erklären könnte.

4.6 Schlussfolgerung

In dieser Promotionsarbeit wurden drei *de novo* Stopp-Mutationen in *SHANK3* analysiert, G1527A, 2497delG und A5008T. Die A5008T Mutation ist die am weitesten C-terminal gelegene Mutation, die bisher identifiziert und charakterisiert wurde. Die nukleäre bzw. synaptische Lokalisation der Fusionsproteine im Neuron ist abhängig von der Länge und den vorhandenen Proteindomänen, wobei der Verlust des C-terminalen Endes ab der Prolin-reichen Region die nukleäre Lokalisation zu begünstigen scheint. Da nur A5008T synaptisch auftrat, konnte übereinstimmend mit der Literatur bestätigt werden, dass die SAM-Domäne für den Transport an die Synapse essentiell ist. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche *SHANK3a* Abbruchproteine verschiedene morphologische Phänotypen bezüglich der zellulären Lokalisation, des Dendritenbaums, der Spines sowie der exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen hervorrufen. *SHANK3* Stopp-Mutationen könnten über veränderte Transkriptionslevel und mangelnde Stabilisierung synaptischer Proteine, durch konformationsbedingte Änderungen des Interaktionsspektrums oder durch ein Ungleichgewicht bzw. den Verlust bestimmter *SHANK3* Isoformen ihre Pathogenität entwickeln. Um zwischen der Symptomatik der drei Patienten und deren neuronaler Molekularbiologie möglicherweise korrelieren zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen in Modellen, die der *in vivo* Situation näher kommen. [22]

4.7 Ausblick

Wie aus den bisherigen Abschnitten hervorging, bleiben noch viele Fragen bezüglich der Auswirkungen der untersuchten *SHANK3* Stopp-Mutationen offen. In zukünftigen Experimenten könnten die funktionellen Folgen der Mutationen genauer untersucht werden, indem z.B. elektrophysiologische Messungen durchgeführt werden. Genauere biochemische Analysen könnten Aufschluss über Veränderungen anderer PSD-Proteinlevel und über die *SHANK3* Isoformzusammensetzung betroffener Zellen geben. Ein zentraler Aspekt zukünftiger Experimente sollte die Wahl eines Modells sein, das der *in vivo* Situation näher kommt. IPS-Zellkulturen wären ein erster Ansatz, um die künstlichen Transfektionsbedingungen zu umgehen und dieselben Gen- und Proteinmengen in Kulturzellen wiederzufinden wie in Patientenzellen. Das bisher am meisten genutzte Tiermodell ist die genetisch veränderte Maus, die sowohl Verhaltensanalysen als auch biochemische, elektrophysiologische und morphologische Untersuchungen in einem funktionierenden Gehirn ermöglicht. Um den oben beschriebenen Hypothesen zur Pathogenese der *SHANK3* Stopp-Mutationen weiter nachzugehen und davon ausgehend evtl. Heilungschancen abzuleiten, ist ein genetisch verändertes Tier vermutlich das Modell der Wahl.

5 Zusammenfassung

Autismus-Spektrum-Störungen (ASS) sind in ihren klinischen Symptomen sehr variabel und können sowohl Umweltfaktoren als auch genetische Veränderungen als Ursache haben. Mit einer Prävalenz von mindestens 0,5% zählt *SHANK3* zu den wichtigsten Kandidatengenen für ASS. Die *SHANK* Genfamilie, bestehend aus *SHANK1*, *SHANK2* und *SHANK3*, kodiert für große Gerüstproteine der Postsynapse exzitatorischer Neurone. Damit kommt den *SHANK* Proteinen eine entscheidende Rolle in der Formation und Plastizität exzitatorischer Synapsen zu.

In dieser Promotionsarbeit wurden drei Stopp-Mutationen im humanen *SHANK3a* charakterisiert, die bei autistischen und geistig behinderten Patienten des Seaver Autism Center in New York im Rahmen einer Studie entdeckt wurden. Die Mutationen *SHANK3* c.1527G>A, c.2497delG und c.5008A>T führten zu Abbrüchen in unterschiedlichen Domänen des Proteins. In HEK293T-Zellen und primärer neuronaler Zellkultur wurden die rekombinanten Fusionsproteine mithilfe von Western Blots und immunzytochemischen Färbungen hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation, der Dendritenmorphologie, der Spines sowie exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen analysiert. Die kürzesten Fusionsproteine c.1527G>A und c.2497delG, denen jeweils fast die gesamte C-terminale Hälfte des Proteins fehlte, waren nicht mehr in der Lage, synaptisch zu lokalisieren und akkumulierten im Zellkern. Beide Mutationsproteine führten im Vergleich zu *SHANK3a* und zur Leervektor-Kontrolle zu einer geringeren Komplexität des Dendritenbaums, zu einer Abnahme der Spines und zu weniger exzitatorischen Synapsen, was das Verhältnis von exzitatorischen zu inhibitorischen neuronalen Eingängen zugunsten der Inhibition veränderte. Im Gegensatz dazu lokalisierte das Abbruchprotein, das auf der c.5008A>T Mutation basierte, überwiegend außerhalb des Zellkerns und z.T. synaptisch. Es zeigte keine negativen Effekte bezüglich der Verzweigung der Dendriten, der Spines und der exzitatorischen Synapsen.

Ausgehend von diesen Daten ließ sich schlussfolgern, dass die nukleäre bzw. synaptische Lokalisation der Fusionsproteine abhängig von der Länge und den vorhandenen Proteindomänen der verkürzten Proteine ist. Übereinstimmend mit der Literatur konnte bestätigt werden, dass die SAM-Domäne (Sterile alpha motif) für den Transport an die Synapse essentiell ist. Darüber hinaus wurde gezeigt,

Zusammenfassung

dass unterschiedliche SHANK3 Abbruchproteine verschiedene morphologische Phänotypen verursachen. Damit liefern sie einen ersten Hinweis für die Ursachen der klinischen Variabilität der Patienten. Die Produkte von SHANK3 Stopp-Mutationen könnten über veränderte Transkriptionslevel und mangelnde Stabilisierung anderer synaptischer Proteine sowie durch konformationsbedingte Änderungen des SHANK3 Interaktionsspektrums ihre Pathogenität entwickeln. Diskutiert wird außerdem ein Ungleichgewicht bzw. der Verlust bestimmter SHANK3 Isoformen.

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zum besseren Verständnis der molekularen Ursachen SHANK3 assoziierter ASS. Über die morphologischen Analysen hinaus wird es in Zukunft von Bedeutung sein, die mutationsbedingten funktionellen und biochemischen Veränderungen zu untersuchen und im Tiermodell Verhaltensanalysen durchzuführen.

Die Ergebnisse dieser Promotion fanden Eingang in die Publikation: Cochoy DM, Kolevzon A, Kajiwara Y, Schoen M, Pascual-Lucas M, Lurie S, Buxbaum JD, Boeckers TM, Schmeisser MJ: **Phenotypic and functional analysis of SHANK3 stop mutations identified in individuals with ASD and/or ID**. Mol Autism 6: 23 (2015).

6 Literaturverzeichnis

- 1 Alareón M, Abrahams BS, Stone JL, Duvall JA, Perederiy JV, Bomar JM, Sebat J, Wigler M, Martin CL, Ledbetter DH, Nelson SF, Cantor RM, Geschwind DH: **Linkage, association and gene-expression analysis identify CHTNAP2 as an autism-susceptibility gene.** AM J Hum Genet 82: 150-159 (2008)
- 2 Amaral DG, Schumann CM, Nordahl CW: **Neuroanatomy of autism.** Trends Neurosci 31: 137-145 (2008)
- 3 Arons MH, Thynne CJ, Grabrucker AM, Li D, Schoen M, Cheyne JE, Böckers TM, Montgomery JM, Garner CC: **Autism-Associated Mutations in ProSAP2/SHANK3 Impair Synaptic Transmission and Neurexin-Neuroligin-Mediated Transsynaptic Signaling.** J Neurosci 32: 14966-14978 (2012)
- 4 Bailey A, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, Montgomery M, Rutter M, Lantos P: **A clinicopathological study of autism.** Brain 121: 889-905 (1998)
- 5 Baker P, Piven J, Schwartz S, Patil S: **Brief report: duplication of chromosome 15q11-13 in two individuals with autistic disorder.** J Autism Dev Disord 24: 529-535 (1994)
- 6 Barger B, Campbell J, McDonough J: **Prevalence and onset of regression within autism spectrum disorders: a meta-analytic review.** J Autism Dev Disord 43: 817-828 (2013)
- 7 Ben-Sasson A, Hen L, Fluss R, Cermak SA, Engel-Yeger B, Gal E: **A meta-analysis of sensory modulation symptoms in individuals with autism spectrum disorders.** J Autism Dev Disord 39: 1-11 (2009)

- 8 Berkel S, Tang W, Treviño M, Vogt M, Obenhaus HA, Gass P, Scherer SW, Sprengel R, Schrott G, Rappold GA: **Inherited and de novo SHANK2 variants associated with autism spectrum disorder impair neuronal morphogenesis and physiology.** Hum Mol Genet 21: 344-357 (2012)
- 9 Betancur C: **Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting.** Brain Res 1380: 42-77 (2011)
- 10 Betancur C, Buxbaum JD: **SHANK3 haploinsufficiency a “common” but underdiagnosed highly penetrant monogenic cause of autism spectrum disorders.** Mol Autism 4:17 (2013)
- 11 Boccuto L, Lauri M, Sarasua SM, Skinner CD, Buccella D, Dwivedi A, Orteschi D, Collins JS, Zollino M, Visconti P, DuPont B, Tiziano D, Schroer RJ, Neri G, Stevenson RE, Gurrieri F, Schwartz CE: **Prevalence of SHANK3 variants in patients with different subtypes of autism spectrum disorders.** Eur J Hum Genet 21: 310-316 (2013)
- 12 Boeckers TM, Kreutz MR, Winter C, Zuschratter W, Smalla KH, Sanmarti-Vila L, Wex H, Langnaese K, Bockmann J, Garner CC, Gundelfinger ED: **Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density.** J Neurosci 19: 6506-6518 (1999)
- 13 Boeckers TM, Liedtke T, Spilker C, Dresbach T, Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED: **C-terminal synaptic targeting elements for postsynaptic density proteins ProSAP1/Shank2 and ProSAP2/Shank3.** J Neurochem 92: 519-524 (2005)

- 14 Boeckers TM, Segger-Junius M, Iglauer P, Bockmann J, Gundelfinger ED, Kreutz MR, Richter D, Kindler S, Kreienkamp HJ: **Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3' untranslated region of Shank1 mRNA.** Mol Cell Neurosci 26: 182-190 (2004)
- 15 Bourgeron T: **A synaptic trek to autism.** Curr Opin Neurobiol 19: 231-234 (2009)
- 16 Bourne JN, Harris KM: **Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines.** Annu Rev Neurosci 31: 47-67 (2008)
- 17 Bozdagi O, Sakurai T, Papapetrou D, Wang X, Dickstein DL, Takahashi N, Kajiwara Y, Yang M, Katz AM, Scattoni ML, Harris MJ, Saxena R, Silverman JL, Crawley JN, Zhou Q, Hof PR, Buxbaum JD: **Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication.** Mol Autism 1: 15 (2010)
- 18 Buxbaum JD: **Multiple rare variants in the etiology of autism spectrum disorders.** Dialogues Clin Neurosci 11: 35-43 (2009)
- 19 Canitano R: **Epilepsy in autism spectrum disorders.** Eur Child Adolesc Psychiatry 16: 61-66 (2007)
- 20 Carlin RK, Grab DJ, Cohen RS, Siekevitz P: **Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities.** J Cell Biol 86: 831-845 (1980)
- 21 Carlson GC: **Glutamate receptor dysfunction and drug targets across models of autism spectrum disorders.** Pharmacol Biochem Behav 100: 850-854 (2012)

- 22 Cochoy DM, Kolevzon A, Kajiwara Y, Schoen M, Pascual-Lucas M, Lurie S, Buxbaum JD, Boeckers TM, Schmeisser MJ: **Phenotypic and functional analysis of SHANK3 stop mutations identified in individuals with ASD and/or ID.** Mol Autism 6: 23 (2015)

- 23 Devlin B, Scherer SW: **Genetic architecture in autism spectrum disorder.** Curr Opin Genet Dev 22: 229-237 (2012)

- 24 Duffney LJ, Wei J, Cheng J, Liu W, Smith KR, Kittler JT, Yan Z: **Shank3 deficiency induces NMDA receptor hypofunction via an actin-dependent mechanism.** J Neurosci 33: 15767-15778 (2013)

- 25 Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsäter H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Roge B, Héron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T: **Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders.** Nat Genet 39: 25-27 (2007)

- 26 Durand CM, Perroy J, Loll F, Perrais D, Fagni L, Bourgeron T, Montcouquiol M, Sans N: **SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism.** Mol Psychiatry 17: 71-84 (2011)

- 27 Feng J, Schroer R, Yan J, Song W, Yang C, Bockholt A, Cook EH Jr, Skinner C, Schwartz CE, Sommer SS: **High frequency of neurexin 1beta signal peptide structural variants in patients with autism.** Neurosci Lett 409: 10-13 (2006)

- 28 Gardener H, Spiegelmann D, Buka SL: **Prenatal risk factors for autism: A comprehensive meta-analysis.** Br J Psychiatry 195: 7-14 (2009)

- 29 Gauthier J, Champagne N, Lafrenière RG, Xiong L, Spiegelman D, Edna Brustein E, Lapointe M, Peng H, Côté M, Noreau A, Hamdan FF, Addington AM, Rapoport JL, DeLisi LE, Krebs MO, Joober R, Fathalli F, Mouaffak F, Haghighi AP, Néri C, Dubé MP, Samuels ME, Marineau C, Stone EA, Awadalla P, Barker PA, Carbonetto S, Drapeau P, Rouleau GA, S2D Team: **De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 in patients ascertained for schizophrenia.** Proc Natl Acad Sci USA 107: 7863-7868 (2010)
- 30 Golub MS, Keen CL, Gershwin ME, Hendrickx AG: **Developmental zinc deficiency and behavior.** J Nutr 125(8 Suppl): 2263S-2271S (1995)
- 31 Gotham K, Bishop SL, Hus V, Huerta M, Lund S, Buja A, Krieger A, Lord C: **Exploring the relationship between anxiety and insistence on sameness in autism spectrum disorders.** Autism Res 6: 33-41 (2013)
- 32 Grabrucker AM: **Environmental factors in autism.** Front Psychiatry 3: 118 (2013)
- 33 Grabrucker AM, Knight MJ, Proepper C, Bockmann J, Joubert M, Rowan M, Nienhaus GU, Garner CC, Bowie JU, Kreutz MR, Gundelfinger ED, Boeckers TM: **Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation.** EMBO J 30: 569-581 (2011)
- 34 Grabrucker AM, Schmeisser MJ, Schoen M, Boeckers TM: **Postsynaptic ProSAP/Shank scaffolds in the cross-hair of synaptopathies.** Trends Cell Biol. 21: 594-603 (2011)
- 35 Grabrucker S, Proepper C, Mangus K, Eckert M, Chhabra R, Schmeisser MJ, Boeckers TM, Grabrucker AM: **The PSD protein ProSAP2/Shank3 displays synapto-nuclear shuttling which is deregulated in a schizophrenia-associated mutation.** Exp Neurol 253: 126-137 (2013)

- 36 Gray EG: **Electron Microscopy of Synaptic Contacts on Dendrite Spines of the Cerebral Cortex**. *Nature* 183: 1592-1593 (1959)
- 37 Grzadzinski R, Huerta M, Lord C: **DSM-5 and autism spectrum disorders (ASDs): an opportunity for identifying ASD subtypes**. *Mol Autism* 4: 12 (2013)
- 38 Guilmatre A, Huguet G, Delorme R, Bourgeron T: **The Emerging Role of SHANK Genes in Neuropsychiatric Disorders**. *Dev Neurobiol* 74(2): 113-122 (2014)
- 39 Gundelfinger ED, Boeckers TM, Baron MK, Bowie JU: **A role for zinc in PSD assembly and plasticity?** *Trends Biochem Sci* 31: 366-373 (2006)
- 40 Haeckel A, Ahuja R, Gundelfinger ED, Qualmann B, Kessels MM: **The Actin-Binding Protein Abp1 Controls Dendritic Spine Morphology and Is Important for Spine Head and Synapse Formation**. *J Neurosci* 28: 10031–10044 (2008)
- 41 Han K, Holder JL Jr, Schaaf CP, Lu H, Chen H, Kang H, Tang J, Wu Z, Hao S, Cheung SW, Yu P, Sun H, Breman AM, Patel A, Lu HC, Zoghbi HY: **SHANK3 overexpression causes manic-like behaviour with unique pharmacogenetic properties**. *Nature* 503: 72-77 (2013)
- 42 Huguet G, Ey E, Bourgeron T: **The genetic landscapes of autism spectrum disorders**. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 14: 191-213 (2013)
- 43 Hutsler JJ, Zhang H: **Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders**. *Brain Res* 1309: 83-94 (2010)

- 44 Jamain S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T; Paris Autism Research International Sibpair Study: **Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism.** Nat Genet 34: 27-29 (2003)
- 45 Jen M, Yan AC: **Syndromes associated with nutritional deficiency and excess.** Clin Dermatol 28: 669-685 (2010)
- 46 Jiang YH, Ehlers MD: **Modeling autism by SHANK gene mutations in mice.** Neuron 78: 8-27 (2013)
- 47 Juranek J, Filipek PA, Berenji GR, Modahl C, Osann K, Spence MA: **Association between amygdala volume and anxiety level: magnetic resonance imaging (MRI) study in autistic children.** J Child Neurol 21: 1051-1058 (2006)
- 48 Kandel ER, Schwarzt JH, Jessell TM: **Principles of neural science** fourth edition. McGraw-Hill, United States, S. 993-994 (2000)
- 49 Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H: **Structure-stability-function relationships of dendritic spines.** Trends Neurosci 26: 360-368 (2003)
- 50 Kemper TL, Bauman ML: **The contribution of neuropathologic studies to the understanding of autism.** Neurol Clin 11: 175-187 (1993)
- 51 Kleijer KT, Schmeisser MJ, Krueger DD, Boeckers TM, Scheiffele P, Bourgeron T, Brose N, Burbach JP: **Neurobiology of autism gene products: towards pathogenesis and drug targets.** Psychopharmacology (Berl) 231: 1037-1062 (2014)

- 52 Kouser M, Speed HE, Dewey CM, Reimers JM, Widman AJ, Gupta N, Liu S, Jaramillo TC, Bangash M, Xiao B, Worley PF, Powell CM: **Loss of predominant Shank3 isoforms results in hippocampus-dependent impairments in behavior and synaptic transmission.** J Neurosci 33: 18448-18468 (2013)
- 53 LeBlanc JJ, Fagiolini M: **Autism: A “critical period” disorder?** Neuronal Plast: 921680 (2011)
- 54 Leblond CS, Nava C, Polge A, Gauthier J, Huguet G, Lumbroso S, Giuliano F, Stordeur C, Depienne C, Mouzat K, Pinto D, Howe J, Lemièrre N, Durand CM, Guibert J, Ey E, Toro R, Peyre H, Mathieu A, Amsellem F, Rastam M, Gillberg IC, Rappold GA, Holt R, Monaco AP, Maestrini E, Galan P, Heron D, Jacquette A, Afenjar A, Rastetter A, Brice A, Devillard F, Assouline B, Laffargue F, Lespinasse J, Chiesa J, Rivier F, Bonneau D, Regnault B, Zelenika D, Delepine M, Lathrop M, Sanlaville D, Schluth-Bolard C, Edery P, Perrin L, Tabet AC, Schmeisser MJ, Boeckers TM, Coleman M, Sato D, Szatmari P, Scherer SW, Rouleau GA, Betancur C, Leboyer M, Gillberg C, Delorme R, Bourgeron T: **Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments.** PLoS Genet 10(9) (2014)
- 55 Leekam SR, Nieto C, Libby SJ, Wing L, Gould J: **Describing the sensory abnormalities of children and adults with autism.** J Autism Dev Disord 37: 894-910 (2007)
- 56 Lim S, Naisbitt S, Yoon J, Hwang JI, Suh PG, Sheng M, Kim E: **Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing, and differential expression in brain and development.** J Biol Chem 274: 29510-29518 (1999)

- 57 Mameza MG, Dvoretzkova E, Bamann M, Hönck HH, Güler T, Boeckers TM, Schoen M, Verpelli C, Sala C, Barsukov I, Dityatev A, Kreienkamp HJ: **SHANK3 gene mutations associated with autism facilitate ligand binding to the Shank3 ankyrin repeat region.** J Biol Chem 288: 26697-26708 (2013)
- 58 Meyer G, Varoquaux F, Neeb A, Oeschlies M, Brose N: **The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: a case study on neuroligin.** Neuropharmacology 47: 724-733 (2004)
- 59 Moore SJ, Turnpenny P, Quinn A, Glover S, Lloyd DJ, Montgomery T, Dean JC: **A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes.** J Med Genet 37: 489-497 (2000)
- 60 Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M: **Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin.** Neuron 23: 569-582 (1999)
- 61 Nicolaï LJ, Ramaekers A, Raemaekers T, Drozdezecki A, Mauss AS, Yan J, Landgraf M, Annaert W, Hassan BA: **Genetically encoded marker sheds light on neuronal connectivity in Drosophila.** Proc Natl Acad Sci USA 107: 20553-20558 (2010)
- 62 Pardo CA, Vargas DL, Zimmerman AW: **Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism.** Int Rev Psychiatry 17: 485-495 (2005)
- 63 Peça J, Feliciano C, Ting JT, Wang W, Wells MF, Venkatraman TN, Lascola CD, Fu Z, Feng G: **Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction.** Nature 472: 437-442 (2011)
- 64 Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM: **Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders.** Nat Neurosci 14: 285-293 (2011)

- 65 Phelan K, McDermid HE: **The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome)**. *Mol Syndromol* 2: 186–201 (2011)
- 66 Quitsch A, Berhörster K, Liew CW, Richter D, Kreienkamp HJ: **Postsynaptic shank antagonizes dendrite branching induced by the leucine-rich repeat protein Densin-180**. *J Neurosci* 25: 479-487 (2005)
- 67 Redecker P, Gundelfinger ED, Boeckers TM: **The cortactin-binding postsynaptic density protein proSAP1 in non-neuronal cells**. *J Histochem Cytochem* 49: 639-648 (2001)
- 68 Rosenmund C, Westbrook GL: **Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity**. *Neuron* 10: 805-814 (1993)
- 69 Roussignol G, Ango F, Romorini S, Tu JC, Sala C, Worley PF, Bockaert J, Fagni L: **Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons**. *J Neurosci* 25: 3560-3570 (2005)
- 70 Sheng M, Kim E: **The postsynaptic organization of synapses**. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 (2011)
- 71 Soorya L, Kolevzon A, Zweifach J, Lim T, Dobry Y, Schwartz L, Frank Y, Wang AT, Cai G, Parkhomenko E, Halpern D, Grodberg D, Angarita B, Willner JP, Yang A, Canitano R, Chaplin W, Betancur C, Buxbaum JD: **Prospective investigation of autism and genotype-phenotype correlations in 22q13 deletion syndrome and SHANK3 deficiency**. *Mol Autism* 4:18 (2013)
- 72 Strömmland K, Nordin V, Miller M, Akerström B, Gillberg C: **Autism in thalidomide embryopathy: a population study**. *Dev Med Child Neurol* 36: 351-356 (1994)
- 73 Szpir M: **Tracing the origins of autism: a spectrum of new studies**. *Environ Health Perspect* 114: 412-418 (2006)

- 74 Toro R, Konyukh M, Delorme R, Leblond C, Chaste P, Fauchereau F, Coleman M, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T: **Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders**. Trends Genet 26: 363-372 (2010)
- 75 Verpelli C, Dvoretzkova E, Vicidomini C, Rossi F, Chiappalone M, Schoen M, Di Stefano B, Mantegazza R, Broccoli V, Böckers TM, Dityatev A, Sala C: **Importance of Shank3 protein in regulating metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) expression and signaling at synapses**. J Biol Chem 286: 34839-34850 (2011)
- 76 Verpelli C, Schmeisser MJ, Sala C, Boeckers TM: **Scaffold Proteins at the Postsynaptic Density**. Adv Exp Med Biol 970: 29-61 (2012)
- 77 Wang X, McCoy PA, Rodriguiz RM, Pan Y, Je HS, Roberts AC, Kim CJ, Berrios J, Colvin JS, Bousquet-Moore D, Lorenzo I, Wu G, Weinberg RJ, Ehlers MD, Philpot BD, Beaudet AL, Wetsel WC, Jiang YH: **Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3**. Hum Mol Genet 20: 3093-3108 (2011)
- 78 Wang X, Xu Q, Bey AL, Lee Y, Jiang YH: **Transcriptional and functional complexity of Shank3 provides a molecular framework to understand the phenotypic heterogeneity of SHANK3 causing autism and Shank3 mutant mice**. Mol Autism 5: 30 (2014)
- 79 Yang M, Bozdagi O, Scattoni ML, Wöhr M, Rouillet FI, Katz AM, Abrams DN, Kalikhman D, Simon H, Woldeyohannes L, Zhang JY, Harris MJ, Saxena R, Silverman JL, Buxbaum JD, Crawley JN: **Reduced excitatory neurotransmission and mild autism-relevant phenotypes in adolescent Shank3 null mutant mice**. J Neurosci 32: 6525-6541 (2012)

- 80 Yao I, Hata Y, Hirao K, Deguchi M, Ide N, Takeuchi M, Takai Y: **Synamon, a novel neuronal protein interacting with synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein**. J Biol Chem 274: 27463-27466 (1999)
- 81 Yasuda H, Yoshida K, Yasuda Y, Tsutsui T: **Infantile zinc deficiency: association with autism spectrum disorders**. Sci Rep 1: 129 (2011)
- 82 Yuste R, Bonhoeffer T: **Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies**. Nat Rev Neurosci 5: 24-34 (2004)
- 83 Zoghbi HY, Bear MF: **Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities**. Cold Spring Harb Perspect Biol 4 (2012)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniela Maria Cochoy
Geburtsort: Kiel
Staatsangeh.: Deutsch

Allgemeine Daten

Schulbesuchszeiten: 1996-2009
Schulabschluss: 2009 Abitur
Hochschulstudium: September 2010 Immatrikulation an der Universität Ulm für Humanmedizin
August/September 2012 Physikum bestanden
April 2016 M2 bestanden

Persönliche Weiterbildung: Forschungsprojekt „Die Veränderlichkeit des Golfstroms in den letzten ca. 2300 Jahren“. Diese Arbeit wurde am IFM-GEOMAR in Kiel durchgeführt. Teilnahme mit dieser Arbeit an Jugend forscht (4. Platz im Bereich Geo-und Raumwissenschaften auf Bundesebene)