

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

**Morphologische Analyse synaptischer Kontakte  
im Cerebellum von *Shank*-Mausmutanten**

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

**Claudia Maria Reinelt**

Ulm

vorgelegt 2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Tobias Böckers

2. Berichterstatter : PD Dr. Ulrike Schulze

Tag der Promotion : 13.07.2017

Teile dieser Arbeit sind in dem Paper "Dysfunctional cerebellar Purkinje cells contribute to autism-like behaviour in *Shank2*-deficient mice" von Saša Peter et al., 2016 in der Zeitschrift Nature Communications veröffentlicht.

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....                                   | <b>II</b> |
| <b>1 Einleitung</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1.1 Autismus .....   | 1         |
| 1.2 Aufbau und synaptische Verschaltung des Cerebellums .....        | 2         |
| 1.3 Aufbau einer PF-PC-Synapse .....                                 | 4         |
| 1.4 Die ProSAP/SHANK-Proteinfamilie .....                            | 6         |
| 1.5 ProSAP/ <i>Shank</i> -Mausmodelle.....                           | 9         |
| 1.6 Morphologische Untersuchungen in <i>Shank</i> -Mausmodellen..... | 13        |
| 1.7 Ziel der Arbeit .....  | 18        |
| <b>2 Material und Methoden</b> .....                                 | <b>20</b> |
| 2.1 Tiere .....  | 20        |
| 2.2 Methoden .....   | 20        |
| <b>3 Ergebnisse</b> .....  | <b>27</b> |
| 3.1 Ergebnisse der Spineanalyse in der Molekularschicht .....        | 27        |
| 3.2 Ergebnisse der PSD-Analyse in der Molekularschicht .....         | 29        |
| 3.3 Ergebnisse der PSD-Analyse in der Körnerzellschicht .....        | 32        |
| <b>4 Diskussion</b> .....  | <b>35</b> |
| 4.1 Diskussion der Spineanalyse.....                                 | 35        |
| 4.2 Diskussion der PSD-Analyse.....                                  | 40        |
| <b>5 Zusammenfassung</b> .....                                       | <b>51</b> |
| <b>6 Literaturverzeichnis</b> .....                                  | <b>53</b> |
| <b>Danksagung</b> .....  | <b>60</b> |
| <b>Lebenslauf</b> .....  | <b>61</b> |

## Abkürzungsverzeichnis:

|             |  |
|-------------|--|
| ASS         | Autismus-Spektrum-Störung  |
| Abp1        | Aktin-bindendes Protein 1 (actin binding protein 1)                    |
| AMPA        | alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid              |
| Ank         | Ankyrin  |
| AS          | Angelman-Syndrom   |
| AWMF        | <i>Arbeitsgem. der Wissenschaftl. Medizinischen Fachgesellschaften</i> |
| $\beta$ PIX | PAK-Interacting Exchange Factor Beta                                   |
| CA          | Cornu ammonis (Ammonshorn)   |
| CF          | Climbing fiber (Kletterfaser)  |
| EM          | Elektronenmikroskopie  |
| Cort        | Cortactin-bindende Stelle (Cortactin-binding site)                     |
| GABA        | $\gamma$ -Aminobuttersäure   |
| GC          | Granule cell (Körnerzelle)   |
| GKAP        | Guanylate-Kinase-assoziiertes Protein                                  |
| GluR        | Glutamatrezeptor   |
| GSK3        | Glykogensynthase-Kinase 3  |
| Hbs         | Homer-bindende Stelle (Homer binding site)                             |
| IRSp53      | Insulin-Rezeptor-Substrat p53  |
| LTP         | Long term potentiation   |
| MAGUK       | membrane-associated guanylate kinase                                   |
| MF          | Moosfaser  |
| mGluR       | metabotroper Glutamatrezeptor  |
| mRNA        | messenger RNA  |
| MSN         | Medium Spiny Neuron  |
| N           | Number   |
| NLGN        | Neurologin   |
| NMDAR       | N-methyl-D-aspartat-Rezeptor   |
| nNOS        | neuronale NO-Synthase  |
| NRXN        | Neurexin   |
| PC          | Purkinjezelle  |

|                              |  |
|------------------------------|--|
| PDZ-Domäne                   | PSD-95/DLG-/ZO1-Domäne                                       |
| PF                           | Parallelfaser  |
| PMS                          | Phelan McDermid Syndrom                                      |
| PSD                          | Postsynaptische Dichte                                       |
| PSD-95                       | Postsynaptisches Dichteprotein-95                            |
| P (100)                      | Postnataler Tag (100)  |
| ProSAP                       | Proline-rich synapse-associated-protein                      |
| RM                           | Rückenmark   |
| SAM-Domäne                   | sterile alpha motif-Domäne                                   |
| SAPAP3                       | SAP90/PSD95-associated protein 3                             |
| SEM                          | Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean) |
| Shank                        | SH3 and ankyrin repeat containing protein                    |
| <i>Shank1</i> <sup>-/-</sup> | <i>Shank1</i> -Knockout-Maus                                 |
| <i>Shank2</i> <sup>-/-</sup> | <i>Shank2</i> -Knockout-Maus                                 |
| <i>Shank3</i> <sup>-/-</sup> | <i>Shank3</i> -Knockout-Maus                                 |
| <i>Shank3</i> <sup>+/-</sup> | Heterozygote <i>Shank3</i> -Knockout-Maus                    |
| <i>Shank3</i> <sup>+/+</sup> | <i>Shank3</i> -Wildtyp                                       |
| SH3-Domäne                   | Scr-homology 3   |
| SPIN90                       | SH3 protein interacting with Nck, 90 kDa                     |
| SSTRIP                       | Somatostatin-receptor-interacting <i>protein</i>             |
| SynGAP                       | Synaptic Ras GTPase-activating protein                       |
| WT                           | Wildtyp  |

# 1 Einleitung

## 1.1 Autismus

Kommunikation und soziale Interaktion sind unabdingbar notwendige Bestandteile, um menschliches Zusammenleben zu ermöglichen. Gerade diese sozialen Fähigkeiten sind bei Autismus, einer lebenslangen, neuropsychiatrischen Entwicklungsstörung, stark beeinträchtigt. Ein Prozent der Bevölkerung, unabhängig von Kultur-, Landes- oder Schichtzugehörigkeit, trägt die Diagnose Autismus. Männer sind ca. viermal häufiger betroffen als Frauen. Da seit der Erstbeschreibung 1943/44 durch Leo Kanner und Hans Asperger bis heute noch keine apparativen Methoden den Nachweis der Erkrankung ermöglichen, erfolgt die Diagnose Autismus klinisch, basierend auf der S3-Leitlinie der AWMF anhand der folgenden Symptom-Trias: Beeinträchtigungen in sozialer Interaktion, Störungen verbaler und nonverbaler Kommunikation, sowie Züge stereotyper Verhaltensweisen. Weitere, häufig auftretende Symptome sind Störungen des Essverhaltens, Schlafstörungen, Hyperaktivität, gestörte Sinneswahrnehmung und, in mehr als der Hälfte aller Fälle, eine deutliche Intelligenzminderung. Nur ca. zehn Prozent zeigen außergewöhnliche Leistungen in speziellen Teilgebieten, eine sogenannte Inselbegabung. Meist treten die ersten Auffälligkeiten noch vor dem zweiten Lebensjahr auf. Die jeweilige Ausprägung der oben genannten Symptome variiert sehr stark. Daraus ergibt sich eine große Bandbreite an Krankheitsbildern und zugleich die Schwierigkeit, Autismus zu erkennen und zu klassifizieren (Kandel et al., 2013).

Eine Möglichkeit, die vielen verschiedenen Formen des Autismus einzuordnen bietet folgende Einteilung in zwei Gruppen: In der ersten Gruppe werden die Autismus-Spektrum Störungen (ASS), wozu frühkindlicher Autismus, Asperger-Syndrom und atypischer Autismus zählen, zusammengefasst. In die zweite Gruppe fallen Syndrome, bei denen Autismus eines von mehreren charakterisierenden Symptomen darstellt. Dazu gehören beispielsweise das Rett-Syndrom, das Phelan McDermid Syndrom oder das Fragile-X-Syndrom. Anhand von Kopplungs- und Assoziationsstudien wurde eine große Anzahl an Genen identifiziert, deren Mutationen zu ASS führen können. Unter diesen ASS-Kandidatengenen befinden sich vor allem Gene, deren Proteine für Zelladhäsion,

synaptische Plastizität und Kommunikation an exzitatorischen Synapsen von großer Bedeutung sind. Zu diesen Genen gehören beispielsweise *NLGN3* und *4*, *NRXN1* sowie die Gene *SHANK1*, *2* und *3* (Huguet et al., 2013). Die Proteine der *SHANK* Gene, *SHANK1*, *SHANK2* und *SHANK3*, haben eine zentrale Bedeutung innerhalb der postsynaptischen Dichte. Da *Shank*-Mausmutanten Grundlage dieser Arbeit sind, wird im Folgenden genauer auf diese Gene und die durch sie kodierten Proteine eingegangen. Neben genetischen Mutationen sind Umweltfaktoren, Viruserkrankungen, Toxinexposition und ein Zinkionenmangel als weitere Autismus auslösende Faktoren beschrieben worden (Grabrucker, 2012). Um weitere Hinweise auf die Entstehung und Entwicklung dieser neuropsychiatrischen Erkrankung zu erhalten, wurden Gehirne von Personen mit der Diagnose Autismus post-mortem sowohl mikro- als auch makroskopisch systematisch untersucht (Amaral et al., 2008). Neben recht heterogenen Auffälligkeiten in Cortex und Hirnstamm, Hippocampus und Amygdala, fanden sich im Kleinhirn autistischer Personen sowohl in post mortem Studien als auch mittels intravitaler bildgebender Verfahren immer wiederkehrende Veränderungen hinsichtlich der Purkinjezellanzahl und -dichte, sowie des cerebellären Volumens. Es ist daher denkbar, dass sich in Kleinhirnen von Autisten auch auf mikroskopischer und ultrastruktureller Ebene Veränderungen nachweisen lassen. *Shank*-Knockout-Modelle bieten die Möglichkeit, morphologische und strukturelle Veränderungen in einem ersten Schritt tierexperimentell zu erfassen. Für derartige Studien sind Kenntnisse über Aufbau und Verschaltung des Cerebellums grundlegend.

## 1.2 Aufbau und synaptische Verschaltung des Cerebellums

Das Kleinhirn ist das wichtigste Zentrum für Koordination und Feinmotorik. Es liegt in der hinteren Schädelgrube und dem Hirnstamm dorsal an. Mit diesem ist es über die drei Kleinhirnstiele verbunden. Diese Bündel von Nervenfasern enthalten sowohl Afferenzen als auch Efferenzen des Kleinhirns. Nach kaudal bildet das Kleinhirn das Dach des vierten Ventrikels, nach kranial ist es durch das Tentorium cerebelli vom Großhirn getrennt. Funktionell lässt sich das Kleinhirn in drei Teile gliedern. Das Pontocerebellum, das Vestibulocerebellum und das Spinocerebellum. Definiert werden diese Anteile durch ihren jeweiligen Faserinput aus Pons, vestibulären Kerngebieten und dem Rückenmark.

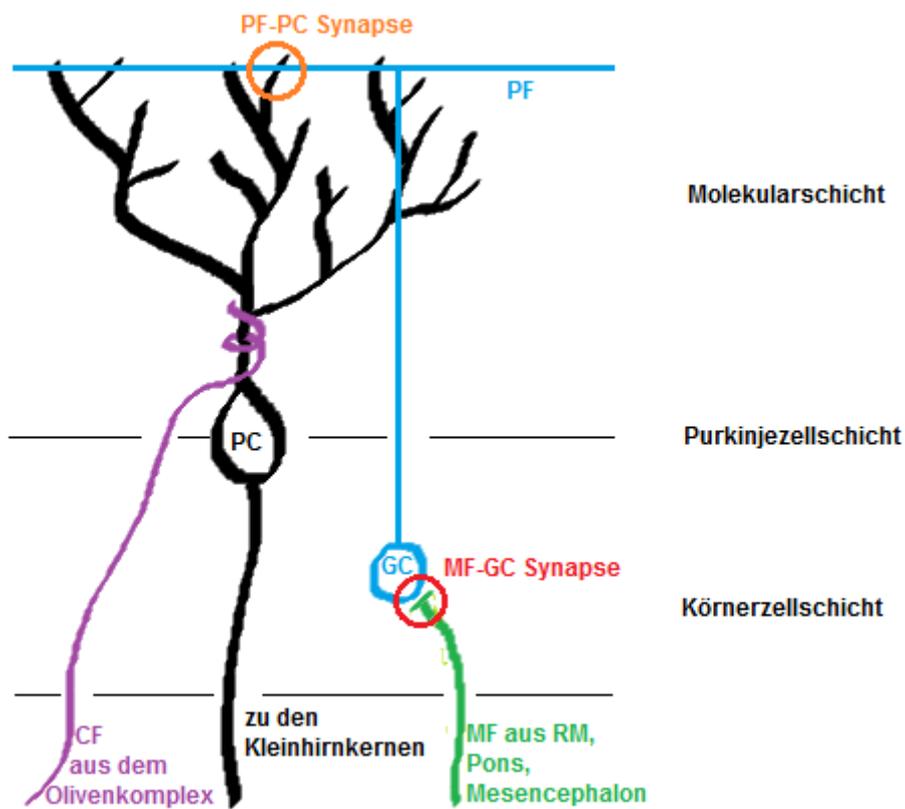
Makroskopisch besteht das Kleinhirn aus weißer und grauer Substanz. Das Marklager erkennt man als weiße Substanz. Die graue Substanz repräsentiert die im Marklager eingebetteten Kleinhirnkerne und den cerebellären Cortex, der das Mark in Windungen umgibt. Mikroskopisch sind im Cortex von distal nach proximal drei Schichten zu erkennen: In der Molekularschicht liegen die Dendritenbäume der Purkinjezellen, sowie die Somata der Korb- und Sternzellen und die Dendriten der Bergmann-Glia. Die Purkinjezellschicht besteht hauptsächlich aus den perlschnurartig aneinandergereihten Somata der Purkinjezellen und vereinzelt Somata der Bergmann-Glia. Die Körnerzellschicht schließt den Cortex nach proximal ab. Sie enthält eine Vielzahl an Körnerzellen und Moosfaserterminalen, die sich in sogenannten Glomeruli cerebellares anordnen. Im Zentrum eines jeden Glomerulus liegt die afferente Moosfaser. Um sie herum sammeln sich die Körnerzellen sowie vereinzelte Golgi-Zellen und bilden über Dendriten Synapsen mit dem Moosfaserterminal. Flügel-Astrozyten umhüllen die Glomeruli. Die synaptische Verschaltung des Cortex ist komplex: Moosfasern aus Mesencephalon, Pons und Rückenmark sowie Kletterfasern aus dem unteren Olivenkomplex gelangen als Afferenzen in den Cortex des Kleinhirns. Während die Kletterfasern direkt im proximalen Anteil der Molekularschicht mit dem Primärdendriten einer Purkinjezelle Synapsen bilden, nehmen die Moosfasern den Umweg über die Körnerzellen. In den Glomeruli cerebellares geben sie die Information an die Körnerzellen weiter, deren Axone als Parallelfasern bis in die distale Molekularschicht aufsteigen, wo sie in der Längsachse der Foliae verlaufen und mit distalen Dendriten vieler Purkinjezellen Synapsen bilden (Kandel et al., 2013). Alle bisher genannten Synapsen sind exzitatorischer, also asymmetrischer Natur. Der Transmitter dieser exzitatorischen Synapsen ist Glutamat. Die Axone der Purkinjezellen sind die einzigen, die die Kleinhirnrinde verlassen. Sie nehmen daher eine zentrale Rolle bei der Informationsverarbeitung im Kleinhirn ein und geben die Information per GABAerger, inhibitorischer Synapsen an die Kleinhirnkerne weiter, deren Axone gebündelt aus dem Kleinhirn austreten.

### 1.3 Aufbau einer PF-PC-Synapse

Überall wo Neurone miteinander kommunizieren, bilden sie Synapsen. Eine Purkinjezelle beispielsweise erhält Informationen von bis zu 200 000 chemischen Synapsen, insbesondere durch Parallelfasern. Eine PF-PC Synapse setzt sich aus einer Präsynapse, hier dem Axonterminal der Parallelfaser, und der Postsynapse, dem Spine eines Dendriten der Purkinjezelle zusammen. Die Präsynapse enthält die Transmitter speichernden Vesikel – bei den Parallelfasern enthalten diese Glutamat – und die Aktive Zone, den Abschnitt der präsynaptischen Membran, mit dem die Vesikel, getriggert durch den intrazellulären Kalziumanstieg, zur Transmitterausschüttung verschmelzen. Das freigesetzte Glutamat gelangt in den Synaptischen Spalt, den Spalt zwischen Prä- und Postsynapse. Seine Breite beträgt zwischen 20 und 40 nm. Die Postsynaptische Membran der Purkinjezellen ist wiederum mit metabotropen Glutamatrezeptoren und AMPA-Rezeptoren besetzt, die, durch das Glutamat aktiviert, intrazelluläre Signalkaskaden in Gang bringen. Diese Signalkaskaden werden zunächst über die postsynaptische Dichte weitergeleitet (Kandel et al., 2013).

Die PSD ist ein komplexes Netzwerk aus vielen verschiedenen Proteinen. Sie liegt gegenüber der Aktiven Zone, unterhalb der postsynaptischen Membran und ist für die Organisation der Signaltransduktion, für synaptische Regulation, Plastizität und möglicherweise auch für die Reifung der Spines und Synapsen zuständig. Durch die eintreffenden Signale und das dynamische Zusammenspiel der Komponenten des Netzwerkes unterliegen PSD und Synapse steten strukturellen Veränderungen. Die Proteine einer PSD können in drei Schichten eingeteilt werden (Verpelli et al., 2012). Die oberste Schicht, die direkt an der postsynaptischen Membran anliegt, enthält die Glutamatrezeptoren. Zur zweiten Schicht zählen vor allem Proteine, die eine große Anzahl an Bindungsdomänen aufweisen und daher viele Protein-Protein-Interaktionen innerhalb des Netzwerkes und seinen Schichten eingehen können. Besonders zu erwähnen ist hier die Familie der MaGUK-Proteine, aber auch die Proteine nNOS, Homer und SynGAP. Die ProSAP/Shanks und die GKAP-Adaptorproteine, bilden die Proteinfamilien der dritten Schicht. Während die GKAP-Proteine vor allem Bindungen mit PSD95 und Motorproteinen eingehen, stellt die Familie der SHANK Proteine als SHANK Plattform die Schnittstelle zwischen dem Zytoskelett und der PSD dar. Sie stehen indirekt über Adaptorproteine und

direkt mit den Glutamatrezeptoren der ersten PSD-Schicht in Kontakt. Über weitere Adaptorproteine, wie z.B. Cortactin,  $\alpha$ -Fodrin und das Actin-binding-protein sind die SHANK-Proteine an das Zytoskelett gebunden (Grabrucker et al. 2011; Verpelli et al. 2012). Ihre zentrale Vermittlerfunktion und die große Anzahl an Domänen, über welche der Proteinkomplex in das postsynaptische Netzwerk integriert ist, machen deutlich, warum aus einem Verlust des SHANK-Proteins möglicherweise Störungen der PSD-Organisation und Funktion resultieren können.

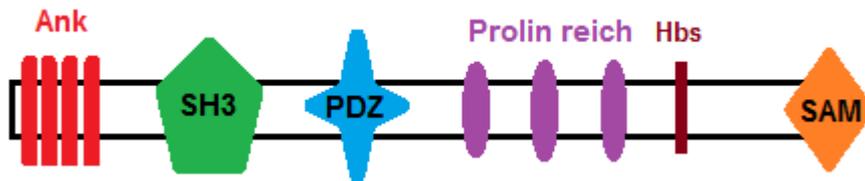


**Abb.1:** Schematische Darstellung der Verschaltung des Kleinhirnkortex. Moosfasern (MF) gelangen in die Körnerzellschicht, wo sie mit den Dendriten der Körnerzellen (GC) Synapsen bilden. Die Axone bilden als Parallelfasern (PF) mit den Dendriten der Purkinjezellen (PC) in der distalen Molekularschicht Synapsen. Die Axone der PC verlassen den Kleinhirnkortex. Kletterfasern (CF) bilden mit dem Primärdendriten der PC Synapsen aus. RM = Rückenmark

## 1.4 Die ProSAP/SHANK-Proteinfamilie

Die ProSAP/SHANK-Proteinfamilie, auch SSTRIP, cortBP oder Synamon genannt, ist eine Gruppe von Gerüstproteinen, welche in der Postsynapse exzitatorischer Synapsen lokalisiert ist. Dort findet man sie in großer Zahl in der untersten Schicht der PSD, wo sie zur Dynamik und Vernetzung des postsynaptischen Netzwerkes beitragen. Entdeckt wurden die ProSAP/SHANK Proteine 1998/99 unabhängig voneinander durch Tobias M. Boeckers und Morgan Sheng. Zur Familie der ProSAP/SHANKs zählen die drei Mitglieder SHANK1, ProSAP1/SHANK2 und ProSAP2/SHANK3 mit ihren jeweiligen Isoformen (Lim et al. 1999; Sheng und Kim, 2000). Diese Isoformen entstehen durch variable Zusammensetzungen der Proteindomänen. Bei SHANK1 und SHANK2 erfolgt die Regulation der Zusammensetzung durch alternatives Splicing (Lim et al., 1999; Wang et al., 2011). Für SHANK3 konnte gezeigt werden, dass auch eine Methylierung der DNA die Zusammensetzung von Isoformen verändern kann. (Zhu et al., 2014). Dennoch besteht innerhalb der Proteinfamilie eine Übereinstimmung in der Zusammensetzung der Hauptdomänen von 63-87% (Lim et al., 1999; Verpelli et al., 2012).

Die Bezeichnungen ProSAP und SHANK sind Akronyme für dasselbe Protein und heben jeweils unterschiedliche, im Protein enthaltene Domänen hervor. So steht der Ausdruck SHANK für „SH3-domain-and-ankyrin-repeat-containing-protein“ während mit der Abkürzung ProSAP, die für „proline-rich-synapse-associated-protein“ steht, andere Domänen des Proteins beschrieben werden (Boeckers et al., 1999; Sheng und Kim, 2000). Der Aufbau der SHANKs und die Komposition ihrer Domänen zeigt Abb. 2. Das N-terminale Ende der Proteine trägt die Ankyrin repeats, die Bindungen mit  $\alpha$ -Fodrin, ein am F-Aktin des Zytoskeletts verankertes Protein, eingehen. Eine Hochregulierung von  $\alpha$ -Fodrin findet sich besonders bei der zytoskelettalen Umstrukturierung. SPIN90, ebenfalls ein Bindungspartner des F-Aktin, interagiert mit der SH3-Domäne und wird, vor allem bei Bindung an SHANK1, in Zusammenhang mit einer Größenzunahme von Spines beobachtet (Kim et al., 2009). Weitere Kopplungen an das Zytoskelett bestehen zwischen der C-terminalen ppl-motif Einheit der SHANKs und dem Cortactin sowie dem Actin-binding Protein. Beide haben Anteil an der Regulation der Spinemorphologie. Daneben bestehen auch noch zahlreiche indirekte Verbindungen zwischen SHANK-Proteinen und dem Aktin-Zytoskelett, beispielsweise über die Proteine IRSp53 und  $\beta$ PIX (Verpelli et al., 2012).



**Abb.2:** Übersicht über die Struktur der Shankproteine, ANK = Ankyrin repeats, SH3 = Scr homology 3, PDZ = PSD-95/DLG-/ZO1, Hbs = Homer-binding-site, SAM = sterile alpha motif Einheit

Auch in Richtung der postsynaptischen Membran sind die SHANKs multipel vernetzt. Über die PDZ-Domäne binden sie direkt an GKAPs, an die GluR1 und, selektiv in den Purkinjenzellen, an die GluR $\delta$ 2-Untereinheit der AMPA-Rezeptoren. Indirekt stehen sie über MAGUKs mit den NMDA-Rezeptoren in Kontakt. Der C-Terminus der Shanks ist über das Protein Homer1b/c, das vor allem bei Vorgängen großer synaptischer Aktivität, wie z.B. LTP hochreguliert wird, an die metabotropen Glutamat-Rezeptoren gebunden. Weitere Bindungen bestehen zu Densin-180, zu einer weiteren Gruppe von Gerüstproteinen, den Fezzins, dem Motorprotein Dynamin und vielen weiteren Proteinen (Grabrucker et al., 2011; Jiang und Ehlers, 2013; Verpelli et al., 2012). Untereinander sind die SHANKs über die C-terminale SAM-Einheit vernetzt. Für die Dichte und die Stabilität dieser ProSAP/SHANK-Plattformen spielt Zink eine überaus wichtige Rolle (Grabrucker et al., 2014). Diese intensive Interaktion und Vernetzung über alle Schichten der PSD und die enge Verknüpfung mit dem Zytoskelett verdeutlichen die zentrale Stellung der Shanks für die Organisation und Funktion innerhalb der PSD, deren Dynamik und die Fähigkeit zur Anpassung an sich ändernde Anforderungen. In mehreren Experimenten wurden Shankproteine im Zusammenhang mit synaptischer Plastizität, sowie Reifung und Formung von Spines gesehen (Bozdagi et al., 2010; Roussignol et al., 2005). Ein Teil der Shankprotein mRNA lagert an den Spines der Dendriten und kann nach lokaler Translation direkt in die PSD eingebaut werden (Boeckers et al., 2004). Die drei Mitglieder der SHANK-Proteinfamilie zeigen zudem eine unterschiedliche Verteilung und Expression an den Synapsen des Körpers.

SHANK1 wird, basierend auf den bisherigen Studien, ausschließlich im Gehirn exprimiert. Innerhalb der Gehirnregionen variiert die Dichte des Proteins. Am stärksten ist es im Cortex exprimiert, es folgen Hippocampus und Cerebellum. Am wenigsten SHANK1 findet sich im

Striatum (Peca et al., 2011). Lokale mRNA von SHANK1 findet sich vor allem in den Dendriten der Purkinjezellen (Boeckers et al., 2004).

Erst seit dem Jahr 2010 wird auch *SHANK2* in Verbindung mit neurologischen Entwicklungsstörungen gebracht (Berkel et al., 2010). Außer im Gehirn findet sich SHANK2 auch noch in Pankreas, Hoden, Lunge, Leber, Hypophyse und Niere. Innerhalb des Gehirns ist SHANK2 am stärksten im Cerebellum und im Cortex exprimiert. Auch im Hippocampus, Striatum und Thalamus kann man es nachweisen. Aufgrund seiner hohen und frühen Präsenz an Synapsen, wird SHANK2 auch als das erste SHANK an den Synapsen bezeichnet (Grabrucker et al., 2011; Verpelli et al. 2012).

SHANK3 war das erste Protein der Familie, das überhaupt mit neuropsychiatrischen Entwicklungsstörungen in Verbindung gebracht wurde (Bonaglia et al., 2001). SHANK3 kommt in beinahe allen Geweben vor. Im Gehirn ist es vor allem an den Synapsen des Striatum und Thalamus, sowie in geringerem Maße im Hippocampus, Cortex und im Cerebellum exprimiert. (Peca et al., 2011; Lim et al. 1999)

Im Cerebellum zeigt sich nach derzeitigem Kenntnisstand ein besonders interessantes Expressionsmuster der SHANK-Proteine: An den MF-GC Synapsen werden nur SHANK1 und SHANK3, nicht aber SHANK2 exprimiert. An den PF-PC Synapsen in der Molekularschicht dagegen finden sich ausschließlich SHANK1 und SHANK2, nicht aber SHANK3 (Boeckers et al., 2004). Diese selektive Expression macht das Kleinhirn für synaptische Analysen in *Shank*-Mausmutanten besonders interessant. Der Knockout nur eines der drei Gene reicht hier bereits aus, um an den Synapsen einen Großteil der Shank Proteinmenge zu eliminieren. Ausschließlich das verbleibende Shankprotein kann jetzt noch exprimiert werden. Damit bietet sich die Möglichkeit, einerseits die Auswirkungen des Shank Proteindefizits, andererseits spezifische Effekte und Charakteristiken des verbliebenen Proteins zu erfassen.

## 1.5 ProSAP/Shank-Mausmodelle

Aufgrund der hohen genetischen Übereinstimmung zwischen Maus und Mensch, eignet sich die Maus, *mus musculus*, gut als Tiermodell in der Forschung von Erkrankungen mit hoher genetischer Penetranz, wie sie auch der Autismus aufweist. Seit der Entdeckung der *SHANK* Gene und seit diese in Verbindung mit Autismus gebracht werden, versuchen Forschungsgruppen anhand von Mausmodellen Erkenntnisse über die Entstehung der Krankheit zu gewinnen. Letztlich geht es darum, mit Hilfe von Mausmodellen die Erkrankung besser verstehen zu können und neue Ansätze für die Therapie des Autismus zu finden. Seit der Verknüpfung von *SHANK* und Autismus wurden in Mäusen, die genetische *Shank* Mutationen trugen, Studien zur Elektrophysiologie, Biochemie und Morphologie an Synapsen sowie Verhaltensanalysen durchgeführt. Die folgende Auswahl an Publikationen soll einen Überblick über die bisher generierten *Shank*-Mausmodelle und die aus ihnen gewonnenen Erkenntnisse zum Thema Autismus geben.

### 1.5.1 *Shank1*-Mausmodelle:

2008 gelang es der Forschungsgruppe um Albert C. Hung eine *Shank1*<sup>-/-</sup>-Mutante zu generieren. Bei dieser Maus waren die Exons 14 und 15, die für die PDZ-Domäne des Shankproteins kodieren deletiert. Diese Domäne spielt für das Synaptische Targeting eine große Rolle (Sala et al., 2001). Neben einem gesteigerten ängstlichen Verhalten und einem verbesserten räumlichen Lernen bei gleichzeitig geringerer Gedächtnisleistung, zeigten die *Shank1*<sup>-/-</sup>-Mutanten auf zellulärer Ebene eine veränderte PSD-Proteinkomposition. Diese ging mit einer 20- bis 30-prozentigen Reduktion der Shank-Bindungsproteine GKAP und Homer 1b/c, sowie morphologischen Veränderungen an Synapsen und einer verringerten basale Transmission einher.

Diese Erkenntnisse wurden durch weitere Verhaltensanalysen an *Shank1*<sup>-/-</sup>-Mausmodellen durch M. Wöhr et al., 2011; Silvermann et al., 2011 und Sungur et al., 2014 erweitert. Alle drei verwendeten die, wie von Hung beschrieben, durch Deletionen der Exons 14 und 15 entstandenen *Shank1*<sup>-/-</sup>-Mutanten. In den Untersuchungen zeigten die Mäuse typische autistische Verhaltensauffälligkeiten wie repetitive Verhaltensweisen und Störungen der Kommunikation und Motorik.

### 1.5.2 *Shank2*-Mausmodelle

Ähnliche Verhaltensweisen zeigte auch das *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mausmodell von Schmeisser et al., 2012: Vermehrtes Angstverhalten, repetitives Fellpflegeverhalten, Hyperaktivität und Störungen des Sozialverhaltens dieser Tiere spiegeln die Hauptsymptome des autistischen Formenkreises wieder. Die Deletion des für die PDZ-Domäne kodierenden Exons 7 führten in diesem Mausmodell zum Wegfall aller bekannten Shank2 Isoformen. Diese Form der Mutation wurde auch schon in Personen mit der Diagnose Autismus nachgewiesen (Berkel et al., 2010). Bei den Versuchstieren zeigten sich zudem einer leichte Reduktion der Spinedichte innerhalb der hippocampalen CA1 Region, eine Hochregulation ionotroper Glutamatrezeptoren, sowie eine reduzierte basale synaptische Übertragung. Das gleichzeitig erhöhte Shank3-Level an diesen Synapsen, wurde als kompensatorischer Vorgang interpretiert.

Im selben Jahr untersuchten Won et al. ein *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mausmodell, das sich durch eine Deletion der Exons 6 und 7 auszeichnete. Auch die hier untersuchten Mäuse zeigten Autismustypische Verhaltensweisen. Bei der synaptischen Übertragung stellten Won et al. eine Reduktion der NMDA-Rezeptor Funktion fest. Wurden diese Rezeptoren mit einem NMDAR-Agonisten behandelt, so besserten sich die autistischen Symptome. Auch die Behandlung mit einem positiven allosterischen mGluR5 Modulator normalisierte die NMDAR Funktion. Dieser Effekt könnte einen kausalen Therapieansatz bieten.

### 1.5.3 *Shank3*-Mausmodelle

Das *SHANK3* Gen liegt auf dem Chromosom 22 und ist bei Patienten, die an einem Chromosom 22q13 Deletionssyndrom, dem sogenannten Phelan McDermid Syndrom leiden, mitbetroffen. Es spricht vieles dafür, dass die Deletionen im *SHANK3* Gen für die zum Krankheitsbild gehörenden ASS verantwortlich sind. Auch de novo Punktmutationen oder heterozygote Mutationen im *SHANK3* Gen reichen aus, um das volle Krankheitsbild des PMS zu induzieren. (Durand et al., 2007, Moessner et al., 2007, Gauthier et al., 2009) Diese Potenz des *SHANK3* Gens hinsichtlich der ASS erklärt die große Anzahl an untersuchten *Shank3*-Mausmodellen:

2010 zeigte die Arbeitsgruppe um O. Bozdagi mit einem *Shank3*<sup>+/-</sup>-Mausmodell, dass allein das Fehlen nur einer einzelnen Genkopie des *Shank3* Gens Auswirkungen auf Verhaltensweisen und die synaptische Übertragung hat und unterstrich damit die Bedeutung des *SHANK3* Gens für die Hirnfunktion. Diese Arbeitsgruppe generierte eine Mauslinie mit einem heterozygoten Knockout für den Abschnitt der Exons 4-9, der für die Ankyrin Domäne kodiert. In diesem Mausmodell untersuchte sie die CA1 Region des Hippocampus und fanden neben einer reduzierten basalen Übertragung, eine gestörte Plastizität an Synapsen sowie Defizite im sozialen Umgang und in der Kommunikation der Versuchstiere.

De novo Missense-Mutationen, die die Exons 5-9 betreffen, wurden bereits bei Autisten beschrieben (Durand et al., 2007, Moessner et al., 2007, J. Gauthier et al., 2009). Eine homozygote Entsprechung bot das Mausmodell von Wang et al., 2011. Die Deletion der Exons 4-9 resultierte in einer homozygoten, isoformspezifischen *Shank3*<sup>e4-9</sup>-Maus, bei der, ähnlich wie in dem von Bozdagi et al., 2010 generierten Modell, die Isoformen Shank3a und b wegfielen. Die Isoformen c-f waren aber noch vorhanden. In den Experimenten zeigte sich eine veränderte PSD Zusammensetzung mit reduzierter Menge an Homer1 b/c, GKAP und GluA1 und eine gestörte LTP-Induktion an den CA1-Schaffer-Kollateralsynapsen. Zusätzlich wiesen die Tiere eine abgeschwächte, aktivitätsabhängige Umverteilung der GluA1 Untereinheiten des AMPAR und morphologische Veränderungen an Spines der CA1 Region auf. Auch bei diesem Mausmodell wurden Autismustypische Verhaltensweisen festgestellt. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied fiel bei der Untersuchung der Motorik auf. Hier zeigten die männlichen Tiere deutlich größere Defizite.

Eine stärkere Reduktion der Shank3-Isoformen gelang im Mausmodell des Teams um Peca et al., 2011. Hier wurden zwei Mutanten generiert. In der *Shank3A*-Mutante kam es zum Wegfall der Ankyrin Domäne und damit zur Deletion der Isoformen Shank3a und b. In der Mutante *Shank3B* fiel die PDZ Domäne weg und damit fehlten die Isoformen Shank3a-d. Der Phänotyp zeigte autistische Verhaltensweisen. Die *Shank3B*-Mutante zeigte deutliches Angstverhalten und vermehrtes Kratzen. Diese Auffälligkeiten waren in der *Shank3A*-Mutante nicht zu beobachten. Auf zellulärer Ebene untersuchte Peca nicht, wie alle bisher genannten Forschungsgruppen, die Hippocampusregion, sondern das dorsale Striatum. Das ist die Hirnregion, die zusammen mit dem Thalamus, die höchsten Shank3-Expressionslevel an Synapsen aufweist. In den verschiedenen Untersuchungen konnten

eine veränderte PSD-Zusammensetzung, einhergehend mit einem Rückgang der Proteine SAPAP3, Homer 1b/c, PSD 93 und der Rezeptoruntereinheiten GluR2, GluN2A und GluN2B und eine Reduktion der PSD Dicke und Länge sowie eine geringere Spinedichte gezeigt werden.

Ihr *Shank2*<sup>-/-</sup>-Modell verglichen Schmeisser et al., 2012 mit einer *Shank3*-Mutante, der die Isoformen Shank3a-c fehlten. Das Mausmodell ähnelt dem von Peca et al.. Interessanterweise wurde eine am ehesten als kompensatorisch zu wertende Erhöhung von Shank2 an Synapsen beobachtet.

Vicidomini et al., 2016 charakterisierten das Verhalten dieses *Shank3*-Mausmodells. In den verschiedenen Verhaltensanalysen wiesen die Mutanten Autismustypische Verhaltensauffälligkeiten auf.

Dass auch das *Shank3*<sup>ΔC/ΔC</sup>-Mausmodell Beeinträchtigungen in sozialem Verhalten, räumlichen Lernen und motorischen Fähigkeiten, allerdings kaum Störungen der Kommunikation aufwies, zeigten M. Kouser et al., 2013. In dieser homozygoten *Shank3*<sup>ΔC/ΔC</sup>- Maus war das Exon 21, welches für die Homer-binding-domain kodiert, ausgeschaltet. Nach Angaben der Arbeitsgruppe führte dies zum Verlust der hauptsächlich natürlich vorkommenden Shank3-Banden. Im Hippocampus fand man eine Reduktion der NMDAR vermittelten, synaptischen Transmission und in fraktionierten Synapsen einen Anstieg von mGluR5.

Eine andere Idee verfolgten Han et al., 2013 in einem neu entwickelten Mausmodell. Es gibt Patienten mit ASS, die eine Duplikation des 22q13 Chromosomenabschnitts und damit auch eine Duplikation des *SHANK3* Gens tragen. Diese Patienten zeigen Hyperaktivität und manisches Verhalten. Ausgehend von dieser Beobachtung wurde nun ein Mausmodell mit einer *Shank3*-Überexpression generiert, in dem zwei- bis dreifach erhöhte Level von Shank3 gemessen wurden. An den Synapsen wurde einhalbmal mehr Shank3 detektiert. Die Spinedichte der pyramidalen Neurone der CA1 Region war erhöht. Die Mäuse zeigten manisches Verhalten, das durch die Gabe von Valproat, nicht aber durch eine Lithiumtherapie gemildert werden konnte. Die Ursache für die Lithiumresistenz vermuten Han et al. in einer Funktionsstörung der Synapsen, denn die GSK3 Signalkaskade, der molekulare Angriffspunkt von Lithium, war bei den *Shank3*-Mutanten intakt. Neben den manischen Episoden waren auch epileptische Anfälle und Hyperaktivität Teil des Phänotyps.

N. Uppal et al., 2015 verwendeten für ihre Analysen das bereits bei Bogdazi et al., 2010 beschriebene Mausmodell und beschränkten sich auf ausschließlich morphologische, elektronenmikroskopische Studien an den Synapsen der Tiere.

Anhand der Vielzahl an Mausmodellen und der durchgeführten Versuche lässt sich zusammenfassend festhalten: Die Rolle von Shankproteinen als „Master of Scaffold“ ist durch die bislang durchgeführten Versuche bestätigt. Sowohl eine Überexpression, als auch ein Mangel oder eine Fehlbildung von Shank an Synapsen haben charakteristische Auswirkungen auf zelluläre Strukturen und den Phänotyp der Versuchstiere. Autistische Verhaltensweisen zeigen sich in allen *Shank*-Mutanten. Alle drei Shankproteine scheinen demzufolge für eine regelrechte neurologische Entwicklung von Bedeutung zu sein. Die mit Shank in Verbindung stehenden Proteine sind bei einer Mutation häufig mitbetroffen. Dies könnte ein Grund für die veränderten zellulären Signalwege sein. Dass eine *Shank*-Mutation Auswirkungen auf verschiedene Hirnregionen hat, wurde vielfach gezeigt. Bisher beschränkten sich die Analysen der Mausmodelle nur auf einige wenige cerebrale Strukturen. Die Untersuchung weiterer Hirnregionen könnte neue Erkenntnisse über die Funktionen von Shankproteinen liefern.

## 1.6 Morphologische Untersuchungen in *Shank*-Mausmodellen

Die Shankproteine machen 5% aller Proteine einer Postsynapse aus (Sugiyama et al., 2005). Als Organisator der PSD werden ihnen übergeordnete Aufgaben in Wachstum, Funktion und Reifung von Spines und Synapsen zugeschrieben. Diese Parameter bestimmen die zelluläre Morphologie mit. Ausgehend von dem Gedanken, dass Mutationen in den SHANK Genen zu sichtbaren, morphologischen Veränderungen an Dendriten, Spines und Synapsen führen und dass Erkenntnisse aus morphologischen Analysen möglicherweise Ansatzpunkte für neue Therapiekonzepte bieten könnten, befasste sich eine Reihe von Untersuchungen mit morphologischen Fragestellungen.

Die folgende Aufzählung soll nun einen Einblick in den bisherigen Stand der wissenschaftlichen Untersuchungen an *Shank*-Mausmodellen hinsichtlich morphologischer Veränderungen an Spines, Synapsen und PSDs geben:

### 1.6.1 *Shank1*-Mausmodelle

Hung et al., 2008 untersuchten in ihrem *Shank1*<sup>-/-</sup>-Mausmodell die hippocampale CA1 Region auf morphologische Veränderungen. Makroskopisch waren zunächst keine morphologischen Veränderungen der Hirnregion zu erkennen. Mikroskopisch fokussierten sie sich auf die apikalen Dendriten der CA1 Region. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten die *Shank1*<sup>-/-</sup>-Mutanten eine leicht verringerte Spinedichte und beim Vergleich der Breite der Spineköpfchen und der Spinelänge zeigte sich in der kumulativen Häufigkeit der Mutanten eine signifikante Verschiebung hin zu kleineren Spines. Die ultrastrukturelle Analyse der PSD mithilfe des Elektronenmikroskops ergab signifikant dünnere PSDs in Mutanten. Die PSD Länge war im Vergleich zu den Wildtypen unverändert. Auch wenn die an diesen Synapsen noch verbleibenden Shankformen Shank2 und Shank3 den Verlust von Shank1 teilweise kompensieren könnten, so unterstreichen die verbliebenen Unterschiede zum Wildtyp die Bedeutung von Shank1 für Wachstum und Stabilität größerer Spines.

### 1.6.2 *Shank2*-Mausmodelle

Auch im *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mausmodell von Schmeisser et al., 2012 war die makroskopische Gehirnmorphologie unauffällig. Die Untersuchungen in der CA1 Region des Hippocampus zeigten eine leichte Reduktion der Spineanzahl im *Shank2*<sup>-/-</sup> Modell. Die PSD Analysen ergaben keine Unterschiede.

Auch Won et al., 2012 konnten in einem ähnlichen Mausmodell keine signifikanten Unterschiede an den PSDs der CA1 Region zwischen Wildtyp und *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mutante feststellen.

### 1.6.3 *Shank3*-Mausmodelle

Peca et al., 2011 untersuchten die Synapsen des Striatums im *Shank3B*<sup>-/-</sup>-Mausmodell. In der Golgifärbung fiel ihnen eine signifikant stärkere Verzweigung des Dendritenbaumes und insgesamt längere Dendriten der MSN auf, was sie als neuronale Hypertrophie beschrieben. Die Spinedichte der *Shank3B*<sup>-/-</sup>-Mutante war signifikant verringert und die

Hälsa der einzelnen Spines leicht verbreitert. Spinelänge und Spinebreite waren unverändert, die PSDs signifikant kürzer und schmaler.

Die Arbeitsgruppe um Wang et al., 2011 untersuchte in der *Shank3<sup>ex4-9</sup>*-Mutante ebenfalls die CA1 Region des Hippocampus. Die Analysen unterschieden sich je nach Lebensalter der Mäuse. Mithilfe der Golgifärbung untersuchten Wang et al. die dendritische Spinemorphologie in vier und zehn Wochen alten Mutanten. In den vier Wochen alten Mutanten war die Spinedichte in der CA1 Region im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert und die Spinelänge signifikant vergrößert. Bei den zehn Wochen alten *Shank3<sup>ex4-9</sup>*-Mutanten zeigte sich die Spinelänge signifikant verkürzt, während sich die Spinedichte nicht mehr von der Kontrollgruppe unterschied. Geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der morphologischen Parameter wurden nicht detektiert. Dass die Unterschiede in der Spinedichte zwischen Kontrollen und Mutanten in den verschiedenen Lebensaltern unterschiedlich ausgeprägt scheinen, wurde einerseits auf die unterschiedliche Sensitivität der verwendeten Methoden zurückgeführt. Gleichzeitig wurden die altersspezifischen Normabweichungen aber auch als Zeichen einer unterschiedlichen Vulnerabilität in den verschiedenen Phasen der neurologischen Entwicklung diskutiert. Die PSD Analysen ergaben hier keine Auffälligkeiten.

Schmeisser et al., 2012 führten die morphologischen Analysen an ihrer *Shank3*-Mutante analog zu den Untersuchungen an dem *Shank2<sup>-/-</sup>*-Mausmodell durch. Hinsichtlich der Spinedichte unterschieden sich Mutanten und Kontrollgruppe nicht. Die PSDs der CA1 Region wurden mittels Elektronenmikroskopie auf ihre Länge und Dicke untersucht. Auch in diesen Parametern konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtypen und Mutanten festgestellt werden.

Auch Han et al., 2013 untersuchten die Spinemorphologie ihres Mausmodells, das aufgrund einer induzierten Überexprimierung um 50 Prozent erhöhte Shank3-Level an Synapsen erreichte. Diese Shank3 Erhöhung ging mit einem um 30 Prozent erhöhten F-Aktin Level einher. Die pyramidalen Neurone der CA1 Region zeigten in der Golgifärbung eine signifikant höhere Spinedichte. Auch dieses Ergebnis bestärkt die Vermutung, dass Shank3 zur Entwicklung der Spines beiträgt.

In den Untersuchungen von Kouser et al., 2013 ließen sich in der CA1 Region der *Shank3<sup>ΔC/ΔC</sup>*-Mutante hinsichtlich der dendritischen Verzweigung und der Spinedichte keine Abweichungen von der Kontrollgruppe ausmachen.

N. Uppal et al., 2015 untersuchten in *Shank3*-Mutanten die Auswirkungen des Alters und des Genotyps auf die Morphologie hippocampaler Synapsen und Spines. Dazu verglichen sie homozygote und heterozygote *Shank3<sup>e4-9</sup>*-Mutanten und Wildtypen zuerst im Alter von fünf Wochen, später im Alter von drei Monaten miteinander. Bis auf eine signifikant erhöhte Anzahl an perforierten Synapsen in den fünf Wochen alten *Shank3<sup>e4-9+/-</sup>*-Mutanten beobachteten sie in keinem der anderen analysierten Parameter signifikante Unterschiede zwischen den drei Untersuchungsgruppen. Uppal et al. vermuten, dass, trotz der wenigen signifikanten Ergebnisse, morphologische Veränderungen in den Mutanten existieren, die möglicherweise wegen ihrer Feinheit nicht zu detektieren sind. Als mögliche Erklärung für die unveränderte Dichte der Synapsen entwickelten sie das Konzept der „silent synapse“. Silent synapses sind morphologisch unauffällige Synapsen, die wegen des Wegfalls von Shankproteinen aber nicht funktionstüchtig sind. Die vermehrte Bildung von perforierten Synapsen in den *Shank3<sup>e4-9+/-</sup>*-Mäusen halten die Autoren für einen zellulären Mechanismus, die inaktiven Synapsen zu kompensieren.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die beschriebenen morphologischen Analysen.

**Tab.1:** Übersicht über eine Auswahl morphologischer Analysen in Modellen mit *Shank*-Mutationen. EM = Elektronenmikroskopie, PSD = Postsynaptische Dichte, DLS = Dorsolaterales Striatum

| Mausmodell  | Region/<br>Alter der Tiere               | Methodik                         | Analysierte<br>Parameter   | Ergebnisse  |
|---|--|----------------------------------|--|---|
| <i>Shank1</i> <sup>e14-15/-</sup><br>Hung et al., 2008                                      | Hippocampus CA1<br>Adult                 | Diolistic labeling               | Spinedichte<br>Spinelänge<br>Spinebreite<br>PSD-Länge<br>PSD-Dicke   | reduziert<br>reduziert<br>reduziert<br>unverändert<br>reduziert               |
| <i>Shank2</i> <sup>e7/-</sup><br>Schmeisser et al.,<br>2012                                 | Hippocampus CA1<br>Adult                 | Klassische<br>Golgifärbung<br>EM | Spinedichte<br>PSD-Länge<br>PSD-Dicke  | reduziert<br>unverändert<br>unverändert                                       |
| <i>Shank2</i> <sup>e6-7/-</sup><br>Won et al., 2012   | Hippocampus CA1<br>8-9 Wochen            | EM                               | PSD-Dichte<br>PSD-Länge<br>PSD-Dicke   | unverändert<br>unverändert<br>unverändert                                     |
| <i>Shank3</i> <sup>e4-9/-</sup><br>Wang et al., 2011  | Hippocampus CA1<br>4 Wochen<br>10 Wochen | FD-Rapid-Golgit<br>EM            | Spinedichte (4We)<br>Spinelänge (4We)<br>Spinedichte (10We)<br>Spinelänge (10We)<br>PSD-Länge<br>PSD-Dicke | reduziert<br>erhöht<br>unverändert<br>reduziert<br>unverändert<br>unverändert |
| <i>Shank3B</i> <sup>-/-</sup><br>Peca et al., 2011  | Striatum DLS<br>5 Wochen                 | Lucifer cell filling<br>EM       | Spinedichte<br>Spinelänge<br>Spinebreite<br>PSD-Länge<br>PSD-Dicke   | reduziert<br>unverändert<br>unverändert<br>reduziert<br>reduziert             |
| <i>Shank3a6</i> <sup>-/-</sup><br>Schmeisser et al.,<br>2012                                | Hippocampus CA1<br>Adult                 | Klassische<br>Golgifärbung<br>EM | Spinedichte<br>PSD-Länge<br>PSD-Dicke  | unverändert<br>unverändert<br>unverändert                                     |
| <i>Shank3</i> <sup>+/-</sup> -<br><b>Überexpression</b><br>Han et al., 2013                 | Hippocampus CA1<br>10 Wochen             | FD-Rapid-Golgit                  | Spinedichte  | erhöht  |
| <i>Shank3</i> <sup>ΔC/ΔC</sup><br>Kouser et al., 2013                                       | Hippocampus CA1<br>6-8 Wochen            | Klassische<br>Golgifärbung       | Spinedichte  | unverändert   |
| <i>Shank3</i> <sup>e4-9/-</sup> -<br><i>Shank3</i> <sup>e4-9+/-</sup><br>Uppal et al., 2015 | Hippocampus CA1<br>5 Wochen,<br>3 Monate | EM                               | Synapsendichte<br>PSD-Länge<br>PSD-Area  | unverändert<br>unverändert<br>unverändert                                     |

Bei der Betrachtung all dieser morphologischen Analysen ist festzustellen, dass die Ergebnisse einerseits eine große Heterogenität aufweisen, andererseits im Einzelnen kaum der Einfluss genotypischer Veränderungen auf den Phänotyp vorhersehbar ist. Diese Formenvielfalt spiegelt sich auch in den verschiedenen Ausprägungen des Autistischen Formenkreises wider. Die Arbeitsgruppen diskutierten verschiedenste Gründe und entwickelten zahlreiche Theorien, um die beobachtete Formenvielfalt zu erklären. Ein Problem besteht darin, dass in den meisten Hirnregionen, wie zum Beispiel in der CA1 Region des Hippocampus physiologischerweise stets alle drei Shankproteine an den

Synapsen präsent und in unterschiedlicher Weise wirksam sind (Peca et al., 2011). Aus dem Knockout nur eines einzelnen *Shank* Gens ist es deshalb schwierig, Aussagen über die Funktion der Shankproteine zu machen, da die beiden übrigen Shankproteine an der Synapse verbleiben. Vielleicht bieten Untersuchungen in einer Hirnregion wie dem Cerebellum mit nur zwei unterschiedlichen Shankproteinen an Synapsen die Chance, der Frage nach der Bedeutung von Shankproteinen für die Morphologie an Synapsen und Spines näher zu kommen. Möglicherweise ist es dort in einem *Shank*<sup>-/-</sup>-Mausmodell möglich, gleichzeitig die Einflüsse des ausgelöschten und des noch an der Synapse verbliebenen Shank zu beobachten.

## 1.7 Ziel der Arbeit

SHANK-Proteine finden sich ubiquitär an exzitatorischen Synapsen des Gehirns.

Eine *SHANK*-Mutation kann demnach Auswirkungen auf viele Hirnregionen gleichzeitig haben. In elektrophysiologischen Untersuchungen an hippocampalen Synapsen von *Shank*-Mausmutanten konnten bereits deutliche funktionelle Defizite nachgewiesen werden (Jiang und Ehlers, 2013). Auch an den Synapsen des Kleinhirns sind elektrophysiologische Veränderungen zu erwarten, die wiederum Auswirkungen auf die Morphologie haben könnten.

Auch aufgrund der zentralen Rolle der Shankproteine für Signalweiterleitung und Organisation innerhalb der PSD ist es vorstellbar, dass ein Verlust von Shankproteinen im Kleinhirn zu Veränderungen von Spine- und PSD-Parametern führt.

Der Blick auf das Kleinhirn wird zusätzlich dadurch besonders interessant, dass aufgrund der zelltypspezifischen Shank-Expression des cerebellären Cortex, sich nach einem *Shank2*- bzw. *Shank3*-Knockouts nur noch Shank1 an den Synapsen befindet und dadurch mögliche Kompensationsmechanismen vermindert werden können. Damit könnten dort resultierende Strukturveränderungen besonders ausgeprägt zu beobachten sein. Aufgrund der geringen verbleibenden Menge an Shank1 an den Synapsen vermuten wir daher, dass in Folge des *Shank*-Knockouts in den Versuchstieren morphologische Veränderungen an deren Synapsen gefunden werden können.

Dazu wurden im Kleinhirn von *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen an den PF-PC Synapsen und in *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mäusen an den MF-GC Synapsen morphologische Parameter analysiert und die Ergebnisse jeweils mit einer Kontrollgruppe verglichen.

Ziel der Arbeit ist es, durch diese morphologischen Analysen cerebellärer Synapsen und Spines in *Shank*-Mausmutanten der Rolle von Shankproteinen für die cerebelläre Pathologie des Autismus näher zu kommen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiere

Für die morphologischen Analysen im Kleinhirn wurden für die Analysen in der Molekularschicht jeweils vier *Shank2*<sup>-/-</sup> und für die Analysen in der Körnerzellschicht jeweils drei *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mausmutanten mit der jeweils gleichen Anzahl an Wildtypkontrolltieren gleichen Alters und Geschlechts, aus gleicher Zucht verglichen. Es wurden ausschließlich Tiere im Alter von P70-110 zur Präparation verwendet. Der genetische Hintergrund der Tiere ist C57BL/6. Die Generierung beider Mauslinien wurde in Schmeisser et. al, 2012 beschrieben. In dem *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mausmodell ist das Exon 7 deletiert. Durch diese Deletion entsteht ein Verlust aller bisher bekannten Shank2-Isoformen.

Im *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mausmodell wird das Exon 11 deletiert. Dadurch gehen die Isoformen Shank3a-c, die Isoformen Shank3e-f bleibt allerdings erhalten.

Alle verwendeten Tiere wurden artgerecht gehalten. Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der deutschen Bundesregierung zum Schutz von Versuchstieren durchgeführt.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Golgi-Färbung

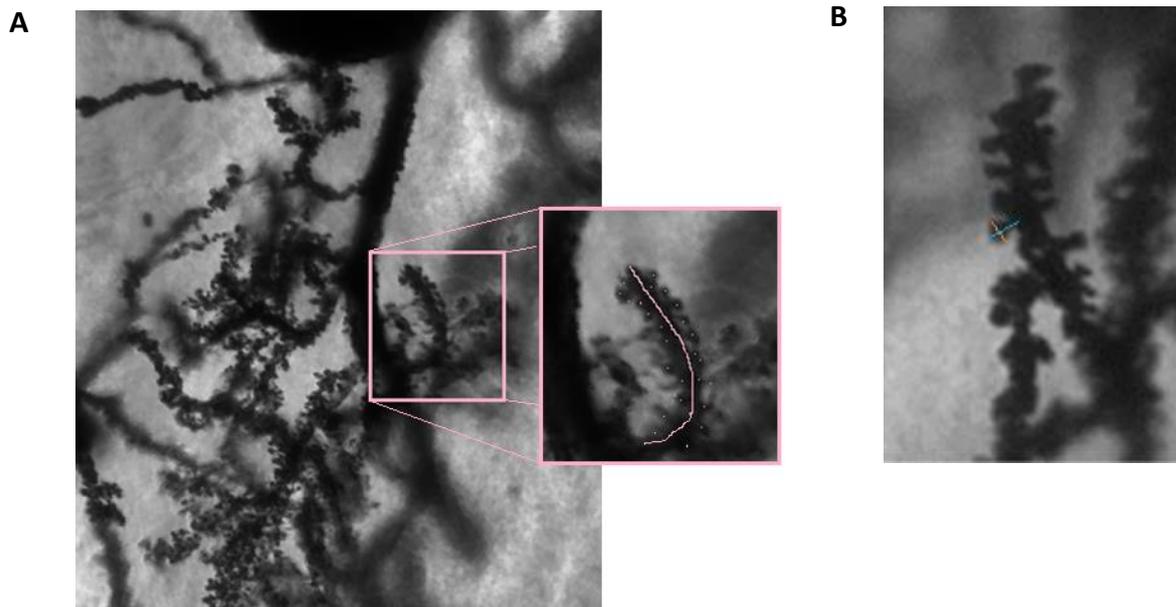
Die Golgi- Färbung, auch „schwarze Reaktion“ oder, gemäß ehemaliger Inhaltstoffe, „Silbernitratfärbung“ genannt, ist ein altes Verfahren, das 1873 von Camillo Golgi entwickelt wurde, um Nervengewebe besser untersuchen zu können. Für die Erkenntnisse, die Golgi und Cajal durch die neue Färbetechnik gewannen, erhielten sie 1906 den Nobelpreis. Das Besondere an dieser Färbung ist, dass per Zufallsprinzip weniger als 1% aller Zellen angefärbt werden. Aus diesem Grund lassen sich selbst in dichtem Nervengewebe einzelne Nervenzellen bis in ihre Ausläufer und Dendriten hinein darstellen

und untersuchen. Das wäre ohne die selektive Färbung nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde die Golgifärbung mit dem Ziel angewendet, in WT und *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen die Spines der distalen Dendriten von Purkinjenzellen in der distalen Molekularschicht darzustellen und einer morphologischen Analyse zu unterziehen. Für die Färbung wurde das FD Rapid GolgiStain™ Kit verwendet, ein Methodenbausatz, der die vier benötigten Lösungen A, B, C, D und E enthält. Für die Präparation der Schnitte wurden zunächst die Gehirne der Tiere, nachdem sie narkotisiert und getötet worden waren, aus dem Schädel entnommen und zur Reinigung in bidestilliertes Wasser gegeben. Nach der Entfernung von Blutresten, wurden die Maushirne für zwei Wochen in die Imprägnierlösung, bestehend aus je 5 ml Lösung A und B eingelegt und, da die beiden Lösungen lichtempfindlich sind, im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Die Lösungen A und B enthalten Quecksilberchlorid, Kaliumchromat und Kaliumdichromat. Am nächsten Tag wurde die Lösung einmalig gewechselt. Nach Ablauf der 14 Tage wurden die Präparate entnommen und für 48 Stunden bei 4°C und Dunkelheit in Lösung C getaucht. Nun folgte das Schneiden der Gehirne. Mit einem Vibratom (Thermo Scientific Microm, HM 650 V von Thermo Scientific in Waltham, Massachusetts, USA) wurden 150 µm dünne coronare Schnitte angefertigt, anschließend auf einen Objektträger aufgezogen und mit einem Tropfen der Lösung C benetzt. Nach dem Trocknen an der Luft bei Raumtemperatur war die Präparation der Schnitte abgeschlossen. Nun folgten die Färbeschritte: Zunächst wurden die Schnitte zweimal je vier Minuten mit bidestilliertem Wasser gespült. In einer Mixtur aus Lösung D, E und bidestilliertem Wasser im Verhältnis 1:1:2 mussten die Schnitte zehn Minuten entwickelt werden. Danach erfolgten wiederum zwei Spüldurchgänge von jeweils vier Minuten Dauer. Als Eindeckmittel wurde Kaisers Glycerin Gelatine bei 55°C verflüssigt und auf die Präparate pipettiert. Die Hirnschnitte wurden schließlich mit Deckgläsern versehen und bis zur Analyse bei Raumtemperatur dunkel gelagert.

#### 2.2.1.1 Spineanalyse

Die Analyse der Spines in der Molekularschicht erfolgte an mit dem FD Rapid GolgiStain™ Kit gefärbten Kleinhirnschnitten. Das Kleinhirn besteht aus den Anteilen Ponto-, Vestibulo und Spinocerebellum. Um reproduzierbare und vergleichbare Analysen zu erhalten wurden

ausschließlich die Spines der Purkinjezellen aus dem Pontocerebellum auf Unterschiede untersucht. Alle Analysen wurden verblindet durchgeführt. Die Lokalisation des Pontocerebellums, das sich lateral des Vermis über beide Kleinhirnhemisphären erstreckt, erfolgte anhand des „Allen Mouse Brain Atlas“. War diese Region im Lichtmikroskop identifiziert, wurden die Purkinjezellen anhand ihres charakteristischen Aussehens ausfindig gemacht. Wegen ihrer großen, birnenförmigen Perikaryen, die am apikalen Pol einen einzigartigen, breit verzweigten Dendritenbaum tragen, sind sie nicht zu verwechseln. Die am weitesten distal liegenden Dendriten wurden in 63-facher Vergrößerung mit dem Axioskop Durchlichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. Dabei wurden Z-Stacks im Abstand von 0,35  $\mu\text{m}$  angefertigt, um anschließend die in einem dreidimensionalen Konstrukt liegenden Dendriten mit der Axiovision Software „Extended Focus Module“ auf ein zweidimensionales Niveau zusammenzufassen. Anhand der Aufnahmen konnten Spinedichte, Spinelänge und Köpfchenbreite analysiert werden. Für die Erfassung der Spinedichte wurde zunächst die Länge des distalen Dendriten vom Punkt der Aufzweigung bis zum am weitesten distal gelegenen Punkt gemessen und entlang dieser Strecke alle Spines gezählt. Als Spine galt jede, von dem Dendritenschaft ausgehende Vorwölbung. Der Quotient aus Spineanzahl und Dendritenlänge ergab die Spinedichte. Pro Tier wurde an mindestens 20 distalen Dendriten jeweils unterschiedlicher Purkinjezellen die Spinedichte ermittelt. Daraus ergaben sich in der Kontrollgruppe  $n = 97$ , in den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen  $n = 89$  ermittelte Spinedichten. Um nun die durchschnittliche Spinedichte von Wildtypen und *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu erhalten, wurden für jeden Genotyp die ermittelten Spinedichten addiert und durch die Anzahl der analysierten Dendriten ( $n = 97$  bzw.  $n = 89$ ) geteilt. Um auch die jeweiligen Spinelängen und Spinebreiten vergleichen zu können, wurden aus sämtlichen Schnitten Spines distaler Purkinjezellendriten, WT  $n = 748$ , *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen  $n = 639$ , ausgemessen. Am größten Durchmesser des Spineköpfchens wurde die Spinebreite gemessen. Abbildung 4B beschreibt die erhobenen Messparameter. Um auch hier die durchschnittlichen Werte für die Mutanten und die Kontrollgruppe zu erhalten, wurde wie bei der Ermittlung der durchschnittlichen Spinedichte vorgegangen.



**Abb.3:** A) Golgi-Färbung, Analyse der Spinedichte an distalen Purkinjezellendriten; B) Vermessung der Parameter Spinebreite (orange) und Spinelänge (blau).

## 2.2.2 Elektronenmikroskopie

Mithilfe der Elektronenmikroskopie wurden die PSDs an Synapsen der Molekularschicht (in *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mutanten) und der Körnerzellschicht (*Shank3*<sup>-/-</sup>-Mutanten) untersucht. Um diese morphologischen Analysen durchführen zu können, werden Ultradünnschnitte der zu untersuchenden Hirnregion benötigt. Die Schnitte müssen sehr dünn sein, damit die Elektronen das Objekt durchstrahlen können. Zwar erfordert die Elektronenmikroskopie eine aufwändige Aufbereitung der Schnitte, bietet aber im Gegenzug ein sehr hohes Auflösungsvermögen. Die derzeitige Auflösungsgrenze liegt bei 0,5 nm. Für die Präparation wurden die Tiere anästhesiert und nach Thorakotomie und Kardiotomie zunächst mit 0,5% heparinierter Kochsalzlösung und anschließend über einen Perfusor mit 20 ml fixiert. Die Perfusionslösung enthielt 2% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd und 1% Saccharose in 0,1 % Cacodylat Puffer mit einem pH von 7,3. Nach Entnahme des Gehirns erfolgte eine zweite Fixation über Nacht in einer Lösung aus 1% Kaliumdichromat, 1% Quecksilberchlorid und 8% Kaliumchromat bei 4 °C. Anschließend wurden die fixierten Hirne mittels Vibratom in 200 µm dünne coronare Scheiben geschnitten. Da die ganzen Scheiben als Präparate für die folgende elektronenmikroskopische Analyse zu groß waren, wurden gezielt die

Bereiche der Körnerzellschicht und der Molekularschicht, die für die jeweiligen Experimente von Interesse waren, in ca. 2 mm<sup>2</sup> große Stücke präpariert. Nach Waschen in 0,1 M phosphatgepufferter Kochsalzlösung für fünf bis zehn Minuten und Nachfixierung der Strukturen in 2% Osmiumtetroxidlösung für zwei Stunden erfolgte die Dehydrierung des Präparats mit Alkohol in aufsteigenden Konzentrationen über jeweils zwei bis drei Minuten. Zur anschließenden Blockkontrastierung diente in Ethanol gelöstes Uranylacetat, worin die Schnitte für 30 Minuten bei 37°C eingetaucht wurden. Die Einbettung der Schnitte in Epoxidharz erfolgte nach erneuter dreimaliger Dehydratation in 100% Alkohol für je 30 Minuten. Aus diesen Harzblöcken wurden anschließend 0,5 µm dünne Schnitte angefertigt und mit Toluidinblau gefärbt. Dieser Schritt diente dazu, mit einem Lichtmikroskop die zu analysierenden Subregionen exakt auffindig zu machen und exzidieren zu können. Die so erhaltenen ca. 1 mm<sup>2</sup> großen Semidünnschnitte wurden nun mittels Ultramicroton auf eine elektronentransparente Schnittstärke von 70 nm verschmälert und zur Stabilisierung auf Kupfernetzste mit einer Gitterbreite von 70 µm aufgetragen.

#### 2.2.2.1 PSD-Analyse

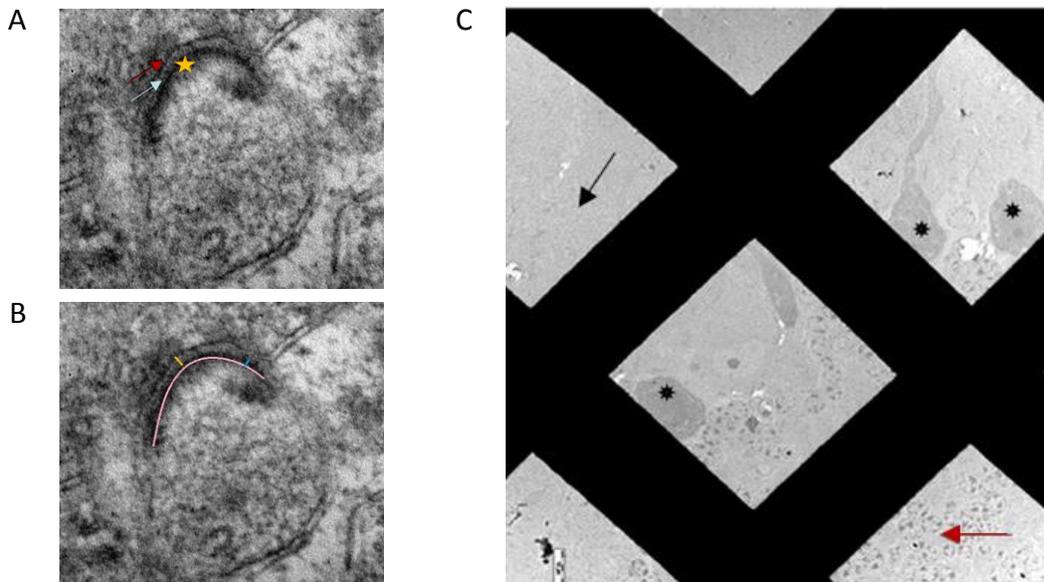
Unter dem Jeol 1400 Transmissionselektronenmikroskop konnten die Ultrastrukturen der Schnitte sichtbar gemacht und Aufnahmen der Synapsen samt PSDs für die morphologische Analyse angefertigt werden. (Software olympus imaging solution, side mounted CCD TEM Camera Olympus Valeta mit 2k x 2k Pixels). Da, wie in der Einleitung bereits ausgeführt, Shank2 im Kleinhirn nur an den PF-PC Synapsen der distalen Molekularschicht und Shank3 nur in der Körnerzellschicht an den Synapsen zwischen Moosfaserterminalen und Körnerzellendriten zu finden sind, wurden für die Analyse der Synapsen in der Molekularschicht Kleinhirnschnitte von *Shank2*<sup>-/-</sup>, für die Synapsen in der Körnerzellschicht von *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mutanten verwendet. In der Übersichtsaufnahme bei 800-facher Vergrößerung konnten die drei Kleinhirnschichten anhand ihrer charakteristischen Morphologie leicht voneinander abgegrenzt werden. Für die Aufnahme von PF-PC Synapsen wurde der distale Anteil der Molekularschicht fokussiert. Um in dieser Region die Synapsendichte zu ermitteln, wurden pro Tier mindestens 50 zufällig ausgewählte, 36µm<sup>2</sup>

große Präparatausschnitte in 25 000-facher Vergrößerung bei einer Beschleunigungsspannung von 120kV aufgenommen. Synapsen wurden anhand der mit Blei deutlich kontrastierten PSD identifiziert. Alle PSDs, die auf den determinierten  $36\mu\text{m}^2$  lagen, wurden mithilfe von ImageJ gezählt und die ermittelte Gesamtzahl durch die Größe der Fläche in  $\mu\text{m}^2$  geteilt. Das Resultat ergab die Synapsendichte pro  $\mu\text{m}^2$ .

Die Vermessung der PSDs wurde in 80 000-facher Vergrößerung vorgenommen. Die als elektronendichteren Streifen charakterisierten PSDs finden sich direkt unter der Membran der Postsynapse. Sie sind deutlich prominenter als die korrespondierenden, in der Präsynapse liegenden aktiven Zonen. In diesem Bereich der Präsynapse sind die mit Transmittern gefüllten Vesikel auszumachen. Getrennt werden die Prä- und Postsynapse durch den synaptischen Spalt, der bei Typ I Synapsen im Mittel ca. 20 nm breit ist und als Kontrollparameter mitgemessen wurde. Nur Synapsen, deren Spaltbreite zwischen 15-40 nm betrug, wurden in die Analyse miteinbezogen. Da Shankproteine bisher ausschließlich an exzitatorischen Synapsen gefunden wurde, war für die Untersuchung von Shankproteineffekten zunächst nur die Analyse asymmetrischer Synapsen von Interesse. Anhand der bereits in der Einleitung genannten Merkmale wurden solche Synapsen für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen identifiziert und die PSDs in Länge und Dicke unter der Verwendung von ImageJ vermessen. Pro Versuchstier wurden mindestens 50 PSDs ausgewertet. Um einen Vergleich der Werte zwischen den verschiedenen Genotypen zu ermöglichen, wurden die Werte der jeweils ermittelten Parameter innerhalb des jeweiligen Genotyps addiert und durch die Gesamtzahl der Messwerte geteilt. Die Ergebnisse von Mutanten und Wildtypen wurden mithilfe von GraphPad Prism 5 ausgewertet und verglichen. Dabei wurde analog der Auswertung der Golgidaten vorgegangen.

Die notwendigen Präparationsschnitte und die folgenden Bestimmungstechniken kamen in vergleichbarer Weise auch bei der Shank3 Analyse zur Anwendung. Für die Analysen der MF-GC Synapsen musste die cerebelläre Körnerzellschicht aufgesucht werden. Ein Moosfaserterminal ist als charakteristisches, meist keulenförmiges und mit unzähligen Vesikeln gefülltes Areal leicht identifizierbar. Das Erscheinungsbild dieser Struktur ist, in Abhängigkeit vom jeweiligen Schnittwinkel, verschieden. Die schwarzen Streifen, als makroskopisches Korrelat elektronendichter PSDs an MF-GC Synapsen, ließen sich sicher identifizieren. Für die Ermittlung der Synapsendichte wurden die Synapsen eines Moosfaserterminals auf einer Fläche von  $36\mu\text{m}^2$  ausgezählt und dann die Dichte pro  $\mu\text{m}^2$

errechnet. Auf diese Weise wurden auch hier pro Versuchstier an mindestens 50 Moosfaserterminalen die Synapsendichte untersucht. Das weitere Vorgehen erfolgte analog der elektronenmikroskopischen Analysen in der Molekularschicht.



**Abb.4:** A/B) Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahme einer PF-PC Synapse aus der Molekularschicht. A) Synapse mit Aktiver Zone (roter Pfeil), Synaptischem Spalt (weißer Pfeil) und PSD (Stern) B) Synapse mit eingezeichneten Messparametern: PSD-Länge (rosa), PSD-Dicke (blau), Breite Synaptischer Spalt (gelb) C) Repräsentative elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme des cerebellären Cortex: Körnerzellschicht (roter Pfeil), Purkinjezellen (Sterne), Molekularschicht (schwarzer Pfeil)

### 2.2.3 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden jeweils mit GraphPad Prism 5 ausgewertet und als Graphen dargestellt. Als statistischer Test wurde, nach Prüfung auf Normalverteilung der Werte, der student's t-test angewendet. Entsprechend der Verteilung keiner Gaußschen Glockenkurve, so griff der Mann-Whitney U Test. Das Signifikanzniveau wurde bei allen morphologischen Analysen auf  $p < 0,05$  festgelegt. Für eine differenzierte Betrachtung wurden die Ergebnisse als absolute und kumulative Häufigkeiten dargestellt

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der Spineanalyse in der Molekularschicht

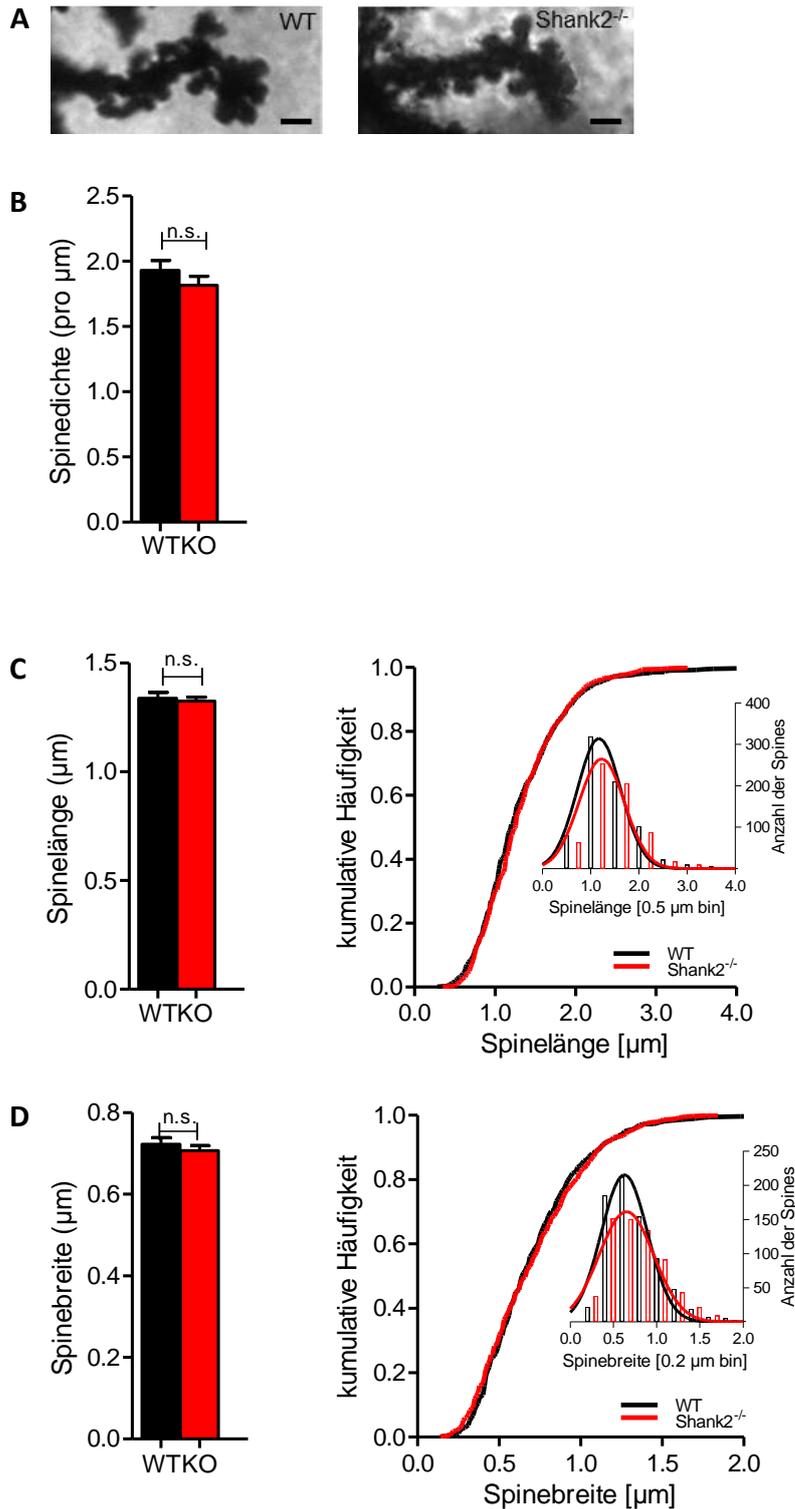
In den mit dem FD Rapid GolgiStain™ Kit gefärbten Kleinhirnschnitten wurden die Parameter Spinedichte, Spinelänge und Spinebreite an den, in der Molekularschicht gelegenen, distalen Dendriten der Purkinjezellen gemessen. Es wurden je Genotyp drei weibliche und ein männliches Tier (N = 4 Wildtypen und N = 4 *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mutanten) auf morphologische Unterschiede dieser Strukturen hin untersucht. Das Alter der Tiere lag zwischen P 70-100. Für die Ermittlung der Spinedichte wurden pro Tier mindestens 20 distale Dendriten untersucht. Bei den WT waren dies insgesamt n = 97 bei den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen n = 89 Dendriten. Die Spinedichte pro  $\mu\text{m}^2$  war bei den WT mit 1,931 Spines/ $\mu\text{m}^2$  im Vergleich zu den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit einem Mittelwert von 1,815 Spines/ $\mu\text{m}^2$  nicht signifikant verändert ( $p = 0,242$ ).

Für die Analysen der Spinelänge und Spinebreite wurden in den WT n = 748 und in den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen n = 639 Spines untersucht.

Hinsichtlich der Spinelänge ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,363$ ). Die Messung der durchschnittlichen Spinelänge lag bei den WT bei 1,338  $\mu\text{m}$  und bei den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen bei 1,324  $\mu\text{m}$ .

Auch in der Breite der Spineköpfchen ergaben sich zwischen WT (mean = 0,723  $\mu\text{m}$ ) und den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen (mean = 0,707  $\mu\text{m}$ ) keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,979$ ).

Die Verteilung der Spinelängen und Spinebreiten wurde durch die Darstellung der kumulativen Häufigkeiten erfasst. (Fig.1)



Erstveröffentlichung in Peter et al., 2016

**Abb.5:** A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von distalen PC-Dendriten in der Molekularschicht von WT und Shank2<sup>-/-</sup>-Mäusen, Messbalken 1μm. B-D Analyse der Spineparameter der distalen PC-Dendriten von WT N=4 und Shank2<sup>-/-</sup> N=4 B) Vergleich der durchschnittlichen Spinedichte ± SEM (WT: 1,931 ± 0,075; Shank2<sup>-/-</sup>: 1,815 ± 0,071), keine signifikanten Veränderungen, p>0,05. Gemessene Dendriten WT n = 97, Shank2<sup>-/-</sup> n = 89. C) Spinelänge dargestellt als Mittelwerte ± SEM (WT: 1,338 ± 0,028; Shank2<sup>-/-</sup>: 1,324 ± 0,019) und als kumulative Häufigkeit sowie Häufigkeitsverteilung mittels Gaußscher Glockenkurve, die die Verteilung aller Spines WT n = 748, Shank2<sup>-/-</sup> n = 639 angeben, p > 0,05. D) Darstellung der Spinebreite als Mittelwerte ± SEM (WT: 0,723 ± 0,016; Shank2<sup>-/-</sup>: 0,707 ± 0,012), Spines WT n = 748, Shank2<sup>-/-</sup> n = 639, p > 0,05. Zur statistischen Analyse wurde der Mann-Whitney U Test verwendet.

## 3.2 Ergebnisse der PSD-Analyse in der Molekularschicht

Synapsendichte, Länge und Dicke der PSDs, sowie die Breite des synaptischen Spaltes wurden in der Molekularschicht, wie oben beschrieben, elektronenmikroskopisch vermessen und analysiert. Zur Bestimmung der Synapsendichte wurden pro Tier mindestens 50 Aufnahmen angefertigt, sodass auf WT  $n = 235$  und *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen  $n = 242$  Aufnahmen die PSDs ausgezählt wurden. Pro Tier wurden mindestens an 50 Synapsen die Parameter Länge und Dicke der PSDs sowie die Breite des synaptischen Spaltes vermessen. Daraus ergaben sich in der Gruppe der WT  $n = 226$  und in der der *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäuse  $n = 243$  untersuchte PSD-Längen, WT  $n = 223$  und *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäuse  $n = 233$  PSD-Dicken sowie WT  $n = 225$ , *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäuse  $n = 241$  vermessene synaptische Spalte. In diesen erfassten Parametern zeigten sich, bis auf die Breite des synaptischen Spaltes, keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT und den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen. (Fig. 2)

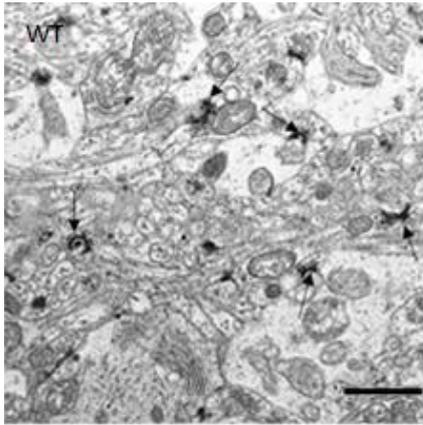
Auf der jeweils betrachteten Fläche von  $36 \mu\text{m}^2$  befanden sich bei den WT durchschnittlich  $0,244$  Synapsen/ $\mu\text{m}^2$ , bei den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen waren es  $0,234$  Synapsen/ $\mu\text{m}^2$  ( $p = 0,678$ ). Die PSD-Längen der beiden Genotypen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p = 0,308$ ). Bei den WT betrug die PSD-Länge durchschnittlich  $313,3$  nm. Bei den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen lag die durchschnittlich gemessene Länge bei  $305,3$  nm. (Fig. 3)

Die Dicke der PSD war bei den Wildtypen mit durchschnittlich  $26,19$  nm leicht, aber nicht signifikant ( $p = 0,934$ ) verbreitert im Vergleich zu dem bei den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen erfassten durchschnittlichen Wert von  $25,99$  nm.

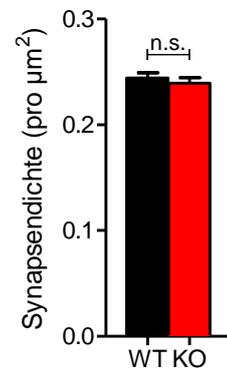
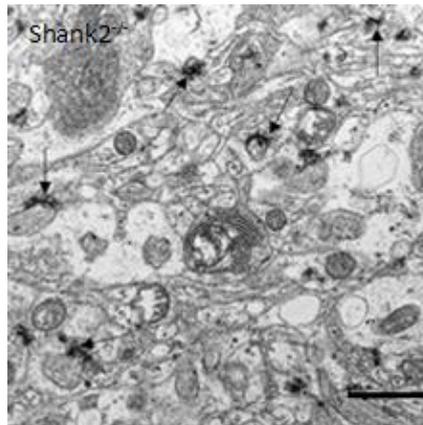
Nur die Analyse der Breite des Synaptischen Spaltes ergab signifikante Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsgruppen. Die Breite des Synaptischen Spaltes betrug bei den WT im Mittel  $23,77$  nm, bei den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen lag sie bei durchschnittlich  $22,19$  nm ( $***p < 0,0001$ ).

Die Graphiken der kumulativen Häufigkeiten spiegeln die Verteilung der PSD-Längen bei WT und *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen wider. Während die Längen und Dicken der PSDs in beiden Gruppen annähernd gleich verteilt sind, haben die Synapsen der WT Mäuse durchgehend einen breiteren Synaptischen Spalt.

A

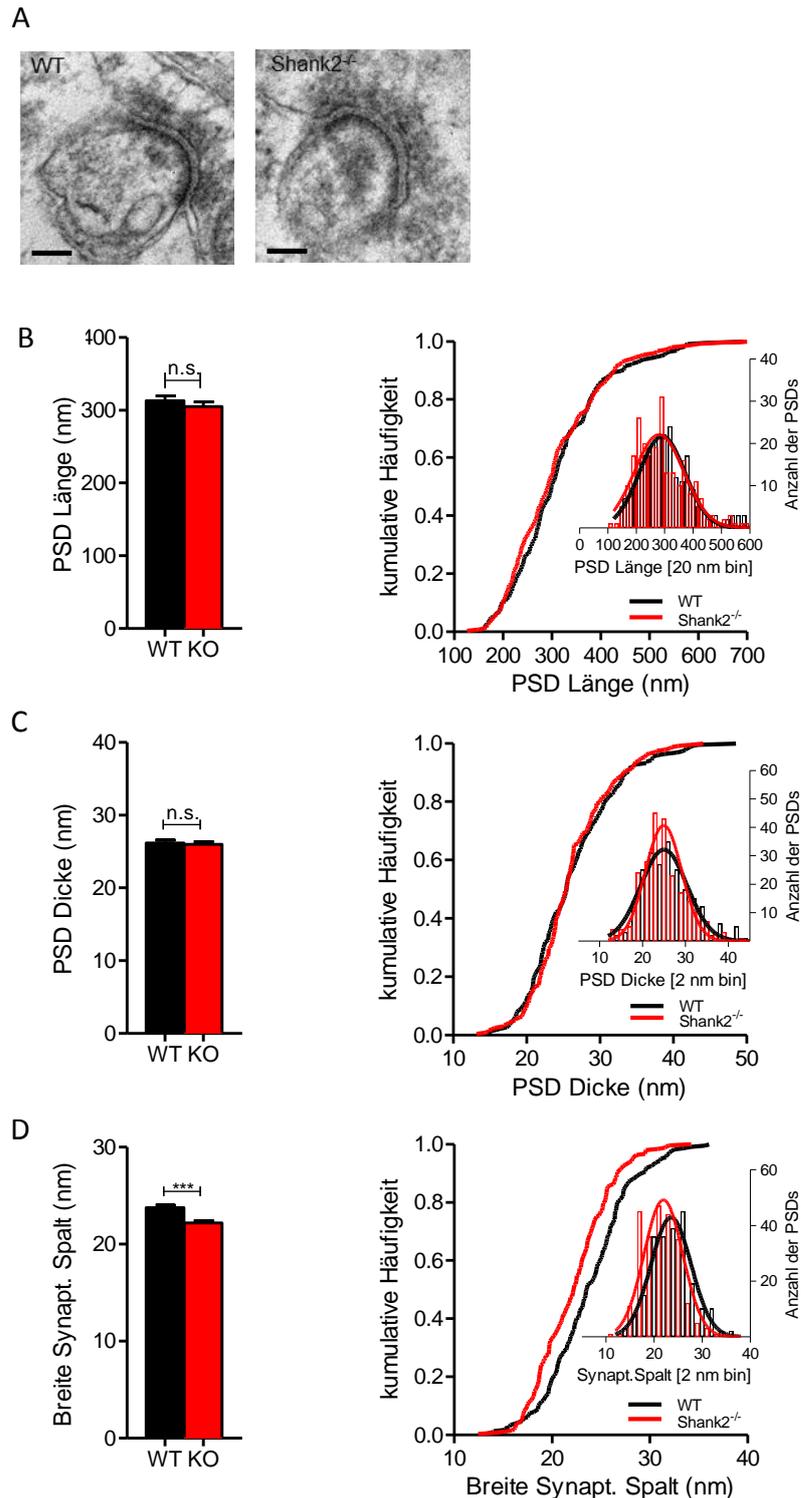


B



Erstveröffentlichung in Peter et al., 2016

**Abb.6:** A) Repräsentative Aufnahme von Synapsen (Pfeile) in der distalen Molekularschicht auf einer Fläche von  $36 \mu\text{m}^2$ . Maßbalken  $1 \mu\text{m}$ , Vergrößerung 25 000x, WT N = 4, *Shank2*<sup>-/-</sup> N = 4. B) Synapsendichte dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (WT:  $0,244 \pm 0,005$ , *Shank2*<sup>-/-</sup>:  $0,234 \pm 0,005$ ), ausgezählte Aufnahmen WT n = 235, *Shank2*<sup>-/-</sup> n = 242. Keine signifikanten Veränderungen,  $p > 0,05$ , Mann-Whitney UTest.



Erstveröffentlichung in Peter et al., 2016

**Abb.7:** A) Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen von analysierten Synapsen in der Molekularschicht von WT und *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen, Messbalken 100nm. B-D Darstellung der PSD Parameter als Mittelwerte (links) und als kumulative Häufigkeiten, sowie als Häufigkeitsverteilungen mittels Gaußscher Glockenkurven (rechts). WT N = 4, *Shank2*<sup>-/-</sup> N = 4. B) Vergleich der PSD-Längen ± SEM, (WT: 313,3 ± 6,459, *Shank2*<sup>-/-</sup>: 305,3 ± 6,173), vermessene PSDs WT n = 226, *Shank2*<sup>-/-</sup> n = 243, p > 0,05, Mann-Whitney U Test. C) Vergleich der PSD-Dicken ± SEM, (WT: 26,19 ± 0,398; *Shank2*<sup>-/-</sup>: 25,99 ± 0,349), vermessene PSDs WT n = 223, *Shank2*<sup>-/-</sup> n = 233, p > 0,05, Mann-Whitney U Test. D) Vergleich der Breite des Synaptischen Spaltes ± SEM (WT: 23,77 ± 0,279; *Shank2*<sup>-/-</sup>: 22,19 ± 0,237) vermessene Spalte WT n = 225, *Shank2*<sup>-/-</sup> n = 241, \*\*\*p < 0,0001, unpaired t-test.

### 3.3 Ergebnisse der PSD-Analyse in der Körnerzellschicht

Die Ultrastruktur der PSDs, die Breite des synaptischen Spaltes sowie die Synapsendichte von *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mausmutanten wurden in der Körnerzellschicht vermessen, analysiert und mit der Kontrollgruppe verglichen. Es zeigten sich bei keinem der gemessenen Parameter signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Die Synapsendichte innerhalb eines Moosfaserterminals wurde bei einer Vergrößerung von 25 000 x auf einer Fläche von 36  $\mu\text{m}^2$  ausgewertet. Pro Tier wurden jeweils 50 Moosfaserterminale ausgezählt. Daraus ergaben sich bei den WT Mäusen n = 158, in den *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mäusen n = 163 analysierte Regionen. Die durchschnittlichen Synapsendichten von WT Mäusen und *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mutanten unterschieden sich nicht signifikant. Bei den WT betrug sie 0,38 Synapsen/ $\mu\text{m}^2$ , bei den *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mäusen 0,39 Synapsen/ $\mu\text{m}^2$  (p = 0,417) (Fig. 4).

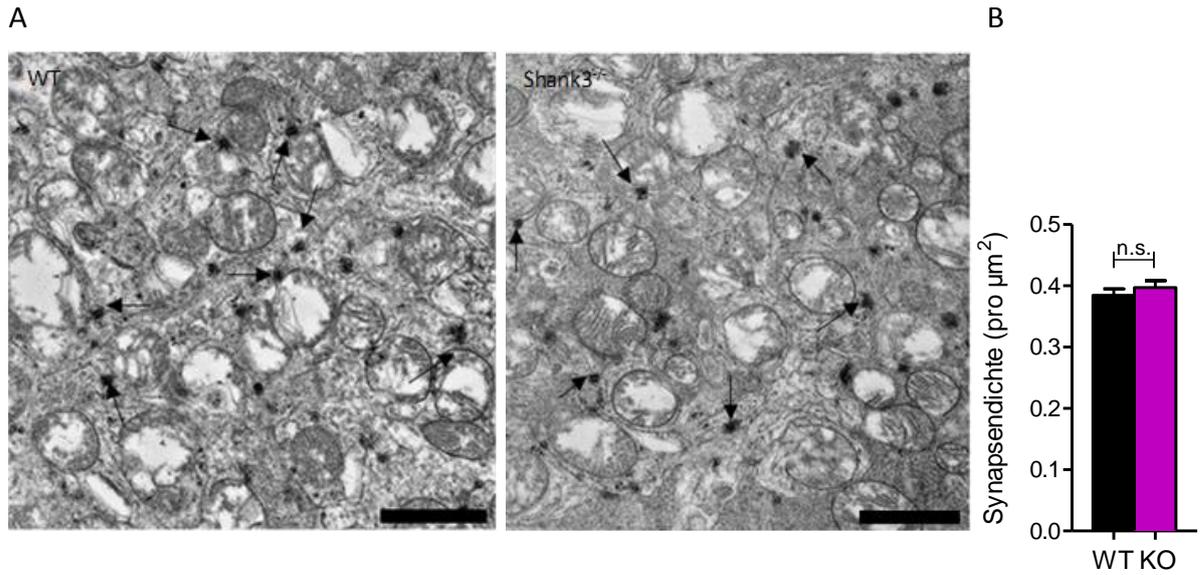
Die Parameter Länge und Dicke der PSD, so wie die Breite des synaptischen Spaltes wurden bei einer Vergrößerung von 80 000 x aufgenommen und anschließend ausgemessen. Zur Erfassung dieser Parameter wurden bei den WT jeweils n = 161, bei den *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mäusen n = 159 Synapsen ausgewertet. (Fig. 5)

Die Länge der PSDs war zwischen Mutanten und Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden (p = 0,673). In der Kontrollgruppe rangierte sie in einem Bereich von 80,39 nm bis 273,70 nm, bei einem Mittelwert von 161,86 nm. Bei den *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mäusen betrug die gemessene Länge mindestens 59,40 nm und maximal 308,95 nm. Die durchschnittliche Länge lag bei 159,92 nm.

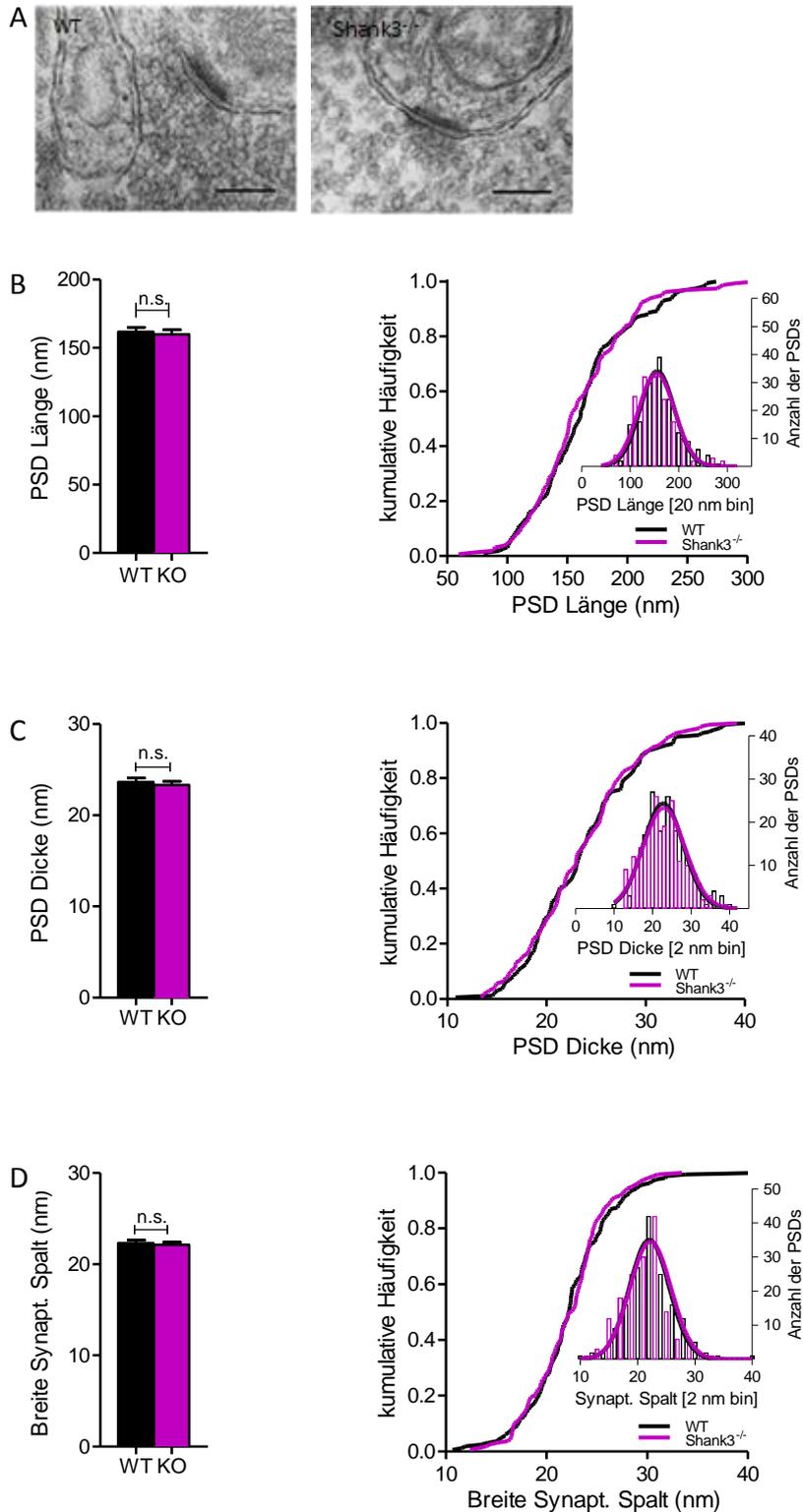
Die Dicke der PSD betrug bei der Kontrollgruppe durchschnittlich 23,62 nm, bei den *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mäusen 23,30 nm und war ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich (p = 0.590).

Auch in der Breite des Synaptischen Spaltes unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant (p = 0,685). Bei der Kontrollgruppe betrug die Breite im Durchschnitt 22,31 nm, bei den Mutanten 22,12 nm.

Die Graphiken der kumulativen Häufigkeit zeigen, dass die analysierten Parameter in beiden Gruppen jeweils gleichmäßig verteilt sind.



**Abb.8:** A) Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen von Synapsen (Pfeile) an Moosfaserterminalen in der Körnerzellschicht von Wildtypen (N = 3) und *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mäusen (N = 3). Maßbalken 1 μm, Vergrößerung 25 000x. B) Synapsendichte dargestellt als Mittelwerte ± SEM (WT: 0,385 ± 0,011, *Shank3*<sup>-/-</sup>: 0,397 ± 0,011), ausgezählte Aufnahmen WT n = 158, *Shank3*<sup>-/-</sup> n = 163. Keine signifikanten Veränderungen, p > 0,05, unpaired t-test.



**Abb.9:** A) Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen von MF-GC Synapsen in der Körnerzellschicht von WT (N = 3) und *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mäusen (N = 3), Vergrößerung 80 000x, Messbalken 200 nm. B-D Darstellung der PSD Parameter als Mittelwerte  $\pm$  SEM und als kumulative Häufigkeiten sowie als Häufigkeitsverteilung mittels Gaußscher Glockenkurven. WT n = 161 und *Shank3*<sup>-/-</sup> n = 159 der jeweiligen Parameter wurden vermessen. B) Vergleich der PSD-Längen, (WT:  $161,80 \pm 3,234$ ; *Shank3*<sup>-/-</sup>:  $159,9 \pm 3,308$ ),  $p > 0,05$ , Mann-Whitney U Test. C) Vergleich der PSD-Dicken, (WT:  $23,63 \pm 0,432$ ; *Shank3*<sup>-/-</sup>:  $23,30 \pm 0,417$ ),  $p > 0,05$ , unpaired t-test. D) Vergleich der Breite des Synaptischen Spaltes (WT:  $22,31 \pm 0,377$ ; *Shank3*<sup>-/-</sup>:  $22,13 \pm 0,295$ ),  $p > 0,05$ , unpaired t-test

## 4 Diskussion

Der vorliegenden Arbeit liegt die Überlegung zugrunde, dass ein Knockout der Gene *Shank2* bzw. *Shank3*, aufgrund ihrer beschriebenen Bedeutung für die Entwicklung neuronaler Strukturen, messbare Auswirkungen auf die Anzahl und Morphologie von cerebellären Spines und PSDs zur Folge haben. Die erhobenen Daten sollen im Folgenden unter Berücksichtigung bisher publizierter Ergebnisse eingeordnet werden.

### 4.1 Diskussion der Spineanalyse

#### 4.1.1 Vergleich der Spineanalyse mit anderen Publikationen

Publikationen zur morphologischen Analyse cerebellärer Spines und synaptischer Strukturen in *Shank*-Knockout Modellen existieren bisher nicht. Daher kann für die Einordnung der hier erhobenen Befunde nur auf die Ergebnisse morphologischer Analysen in anderen Hirnregionen zurückgegriffen werden. In einer Reihe von Studien wurden die genetischen Veränderungen die einen Verlust von Shankproteinen zur Folge hatten charakterisiert. In Tabelle 1 sind die Publikationen aufgeführt, in denen morphologische Befunde von Spines und Synapsen beschrieben wurden.

Die Ergebnisse dieser Publikationen, die sich in *Shank*-Mausmodellen mit der Morphologie von Spines beschäftigen, sind nicht einheitlich. Ein Vergleich der Publikationen hinsichtlich der gemessenen Unterschiede in Spinedichte, Spinelänge und Spinebreite zwischen Mutanten und Wildtypen ergibt eine gewisse Streuung der Ergebnisse.

Diese große Bandbreite an Ergebnissen kann mehrere Ursachen haben. Einerseits wurden hier Publikationen verglichen, die *Shank*-Mausmodelle jeweils basierend auf unterschiedlicher genetischer Manipulation verwendeten. Jüngste Studienergebnisse zeigen darüber hinaus, dass verschiedene Isoformen eines Shankproteins unterschiedliche Auswirkungen auf die Morphologie dendritischer Spines haben können (Wang et al., 2014). Andererseits unterscheiden sich die publizierten Analysen jeweils in der Verwendung von

Material und Methodik sowie im Alter der analysierten Tiere. Auch durch die Methodik bedingte Messungenauigkeiten könnten Ursache für die verschiedenen Ergebnisse sein.

In Anbetracht der Heterogenität der Ergebnisse zur Spineanalyse ist eine Einordnung der hier erhobenen cerebellären Daten mithilfe der Ergebnisse anderer *Shank*-Mausmodelle weder richtungsweisend noch aussagekräftig.

Vergleicht man nur die publizierten Ergebnisse zur Spinedichte aus *Shank2*-Modellen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, stimmen die Ergebnisse überein. Die Spinedichte zwischen Mutanten und Wildtypen ist jeweils nicht verändert. Allerdings ist die Anzahl dieser Publikationen gering und wegen fehlender Messungen der restlichen Parameter bleibt eine vergleichende Aussage auf die Spinedichte beschränkt.

Unabhängig von *Shank*-Mausmodellen könnten auch Analysen zur cerebellären Morphologie von Spines und Synapsen in anderen genetischen Autismusmodellen einen Anhaltspunkt für die Einordnung der hier erhobenen Daten bieten.

Das Angelman-Syndrom (AS) gehört zu den Erkrankungen des syndromatischen Autismus. Denn neben gestörter motorischer und mentaler Entwicklung erfüllen viele AS-Patienten zusätzlich die Diagnosekriterien für Autismus. Der Verlust der maternal exprimierten Ubiquitin Proteinligase UBE3A führt beim AS zu neurologischen Entwicklungsstörungen. Frühere Studien haben gezeigt, dass Änderungen motorischer Bewegungsabläufe mit morphologischen Veränderungen von PC-Spines einhergehen (Lee et al., 2007). Aufgrund der stark veränderten Motorik in AS Patienten untersuchten J. Sun et al., 2015 in mit dem FD GolgiRapid™ Kit gefärbten Kleinhirnschnitten die Spinedichte an PC-Dendriten in AS Mausmodellen und verglichen sie mit Wildtypen. Die Spinedichte von AS Mäusen war gegenüber den Wildtypen signifikant verringert. Durch die Behandlung mit dem Immunsuppressivum Rapamycin konnte der Phänotyp der Mutanten wieder aufgehoben werden.

Wei H. et al., 2012 untersuchten Spinedichte und Spinelänge an den Dendriten von kultivierten, cerebellären Körnerzellen von *Fmr1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und verglichen die Daten mit einer Kontrollgruppe. Mutationen im *FMR1*-Gen sind Ursache des Fragilen X-Syndroms, einer Erkrankung, die ebenfalls zum Syndromatischen Autismus gezählt wird. Die Dichte der Mushroom Spines war bei den *Fmr1*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant verringert. Statt der pilzförmigen Ausstülpungen bildeten sie viele signifikant längere Spines als die WT. Durch eine Behandlung mit Memantin konnte der Phänotyp teilweise aufgehoben werden.

Der Versuch, anhand bereits publizierter Daten die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse einzuordnen zeigt, wie problematisch der Vergleich von genetischen Mutationen ist, die mit Autismus in Verbindung gebracht werden. Bereits sehr ähnliche genetische Unterschiede können hier verschiedenste morphologische Ausprägungen zeigen. Diese Beobachtung steht im Kontext zu den unterschiedlichen Ausprägungen der Krankheiten des autistischen Formenkreises und weist nochmals daraufhin, dass jeder einzelne Fall von Autismus ganz individuell betrachtet werden muss.

## 4.1.2 Diskussion der einzelnen Spineparameter

### 4.1.2.1 Spinedichte

Shankproteine werden mit Entstehung, Proliferation und Morphologie von Spines in Verbindung gebracht. Ein Verlust von Shankproteinen lässt Defizite in diesen Bereichen der Spineentwicklung erwarten. Um fundierte Aussagen über die Ergebnisse der Spineanalyse treffen zu können, ist es sinnvoll, sich zunächst die bisherigen Erkenntnisse und Theorien zur Entwicklung und Formation von Spines vor Augen zu führen.

R. Yuste und T. Bonhoeffer, 2004 berichten in ihrem Review über die bisher unternommenen Versuche und die daraus gewonnenen Erkenntnisse zur Entwicklung von Spines. Neben den Pyramidenzellen des Hippocampus wurden dabei vor allem cerebelläre Purkinjezellen als Versuchszellen verwendet und anhand der erhobenen Daten Theorien zur Spineentwicklung in Purkinjezellen entwickelt:

Purkinjezellen bilden auch in Abwesenheit von Körnerzellen morphologisch unauffällige Spines aus. Daher wird davon ausgegangen, dass der Anstoß zur Spinebildung von den Purkinjezellen ausgeht und auch unabhängig von äußeren Einflüssen funktioniert (Sotelo-Modell). Für diese Theorie spricht auch die Beobachtung Larramendis. Er stellte fest, dass Purkinjezellen schon Spines entwickelt hatten bevor sie synaptische Kontakte mit den Parallelfasern ausbildeten. Sie konnten also nicht von den Parallelfasern zur Spinebildung angeregt worden sein.

Für die meisten Spines gilt, dass die Synaptische Aktivität und das Lebensalter einen Einfluss auf die Spineentwicklung und -dichte haben. Allgemein wird von zwei Phasen der

Spineentwicklung ausgegangen - der Phase der Spineproliferation und der Phase des altersabhängigen Spinerückgangs. Die Spinedichte ist demnach abhängig vom Alter der Mäuse. Die Synaptische Aktivität jedoch scheint keinen Einfluss auf die Dichte der PF-PC Synapsen zu nehmen. Sie werden „intrinsisch angelegt“ und unabhängig von der synaptischen Aktivität aufrechterhalten (Yuste und Bonhoeffer, 2004).

Unabhängig davon, welcher Erklärungsansatz für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Spinedichte herangezogen wird, zeigt diese Arbeit, dass Shank2 keinen Einfluss auf die Spinebildung und Spinedichte an Dendriten der Purkinjezellen hat.

#### 4.1.2.2 Spinelänge und Spinebreite

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich zwischen *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtypen auch hinsichtlich der Spinebreite keine Unterschiede. Dieser Befund lässt vermuten, dass Shank2 auch auf die Breite der Spineköpfchen keinen messbaren Einfluss besitzt. Anhand der bisherigen Kenntnisse zur Morphologie von Spines soll diese Vermutung überprüft werden: Spines können sich in unterschiedlichen Formen darstellen und sind aufgrund neuronaler Anpassungsprozesse einem steten Wandel unterworfen.

Bei der Klassifikation der Spinemorphologie werden traditionell die Spineformen „Stubby“, „Thin“ und „Mushroom-like“ unterschieden. Stubby Spines gelten als unreife Spines, die sich noch in der Entwicklung befinden. An älteren Neuronen findet man überwiegend Mushroom-like oder Thin Spines. Bei diesen beiden Formen ist der Kopf der Spines morphologisch klar vom Hals der Spines abzugrenzen (Yuste und Bonhoeffer, 2004). Aufgrund dieser Abgrenzbarkeit von Spinehals und -köpfchen liegen bei den hier untersuchten Tieren überwiegend die beiden letzteren Formen vor.

Veränderungen von Spinemorphologien und der Umsatz von Spines werden mit Lernprozessen in Verbindung gebracht (Engert und Bonhoeffer, 1999; Yuste und Bonhoeffer, 2004). Lernschwächen gelten als Merkmal autistischer Verhaltensstörungen. Es ist denkbar, dass der Grund dafür in einem gestörten Turnover von Spines liegt.

Normalerweise unterliegen Spines einem steten Turnover, einem morphologischen Wandel, über den sowohl ihre Neubildung als auch ihr Untergang gesteuert werden. Ein defekter Turnover könnte eine geringere Neubildung von Spines sowie die Stagnation der

Spines in stabilen, sich an wechselnde Anforderungen nicht mehr anpassungsfähige Spineformen zur Folge haben. Es wäre daher vorstellbar, dass der Shank2 Verlust einen gestörten Turnover von Spines verursacht und dieser in den verbreiterten Spineköpfchen resultiert.

Da sich Wildtypen und *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäuse in dieser Arbeit aber hinsichtlich der Spinebreite nicht unterscheiden, scheint das Shank2-Protein weder für die Morphologie von Spines, noch für deren Turnover verantwortlich zu sein.

Die Spinelänge zwischen WT und *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen war nicht signifikant verändert. Anhand der Datenlage ist daher davon auszugehen, dass ein Shank2 Verlust keine Auswirkungen auf die Länge von Spines hat.

In Publikationen, deren morphologischen Untersuchungen ebenfalls keine Unterschiede in der Spinelänge ergaben, werden Kompensationsmechanismen innerhalb der Shank-Proteinfamilie als Ursache für die fehlenden Auswirkungen diskutiert. Schmeisser et al. 2012 waren in ihrer *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mutante eine kompensatorische Erhöhung von Shank3 aufgefallen.

An den hier analysierten PF-PC Synapsen kommt aus der Shank-Proteinfamilie nur Shank1 für Kompensationsmechanismen in Frage. Wenn Shank1 die Fähigkeit besitzt, die Aufgaben von Shank2 zu übernehmen, könnte dies erklären, warum sich die Spineparameter zwischen Mutanten und Wildtypen trotz des Shank2 Verlustes nicht signifikant unterscheiden. Sind die Proteine der Shankfamilie in der Lage auch die Aufgaben ihrer anderen Mitglieder zu erfüllen?

Publikationen zeigen, dass allein die Mutation verschiedener, einzelner Shank3 Isoformen unterschiedliche Auswirkungen auf die Funktion einer Synapse hat. Jede einzelne Isoform übernimmt eine ganz individuelle Funktion an der Synapse. (Wang et. al., 2014). Die Aufgaben der Shankproteine scheinen speziell verteilt und determiniert. Daher ist nicht klar, ob Shank1 zu einer Kompensation von Shank2 überhaupt in der Lage ist.

Eine vergleichende Untersuchung von cerebellären Shank1-Konzentrationen in *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtypen könnte Hinweise liefern, ob auch in dem hier verwendeten Mausmodell ein Shank1 induzierter Kompensationsmechanismus vorliegt.

### 4.1.3 Zusammenfassung der Erkenntnisse der Spineanalyse

Bisher veröffentlichte Studien in *Shank*-Mausmodellen berichten von unterschiedlichen Auswirkungen auf die Morphologie und Dichte von Spines. In der vorliegenden Arbeit wurden in keinem der Parameter signifikante Veränderungen festgestellt. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass *Shank2* keinen Einfluss auf die Dichte und die Morphologie von Spines an hat.

Im Gegensatz dazu besteht die Möglichkeit, dass Kompensationsfaktoren, wie bspw. das an den Synapsen verbleibende *Shank1*, das Aktin-Zytoseklett oder Bindungsproteine innerhalb der PSD, die entstandenen Defizite zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits ausgeglichen haben. Die bestehenden, leicht verbreiterten Spineköpfchen der *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäuse könnten das morphologische Korrelat eines gestörten Spineturnover infolge eines *Shank* Verlustes darstellen.

Die hier verwendete Methode reduziert, wie jedes Schnittbild, das dreidimensionale, dynamische Gefüge der Molekularschicht auf eine zweidimensionale, statische Fläche. Alle postmortalen Schnittbilder können naturgemäß immer nur einen bestimmten Zeitpunkt in der Entwicklung der dargestellten Strukturen festhalten. Die Abbildung eventuell relevanter, dynamischer Veränderungen in der Entwicklung von Spines bleibt anderen Verfahren vorbehalten. Für weitere Interpretationen und Einordnungen der in dieser Arbeit erhobenen Daten zur Spineanalyse sind weitere morphologische Analysen im Kleinhirn von *Shank*-Mausmodellen vonnöten.

## 4.2 Diskussion der PSD-Analyse

Für die PSD-Analyse wurden sowohl Synapsen in der Körnerzellschicht von *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mäusen als auch Synapsen in der Molekularschicht von *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit dem Elektronenmikroskop untersucht und jeweils mit einer Kontrollgruppe verglichen. Um die morphologischen Analysen in der Molekularschicht abzuschließen, werden zuerst die Ergebnisse der PSD-Analysen in den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mutanten besprochen. Auch für die Ergebnisse der PSD-Analyse soll zunächst eine Gegenüberstellung mit den bisherigen elektronenmikroskopischen Morpho-Analysen in *Shank*-Knockout Modellen erfolgen und

dadurch eine Einstufung der Ergebnisse ermöglicht werden (Tab.1). Wie im Bereich der Spineanalyse existieren auch für die PSD-Analyse keine publizierten, cerebellären Daten, sodass auch hierfür auf die Analysen in anderen Hirnregionen zurückgegriffen werden muss.

## 4.2.1 PSD-Analyse in der Molekularschicht

### 4.2.1.1 Vergleich der PSD-Analyse mit anderen Publikationen

In der vorliegenden Arbeit wurde für die PSD-Analyse in der Molekularschicht die Dichte der Synapsen, die Länge, und die Dicke der PSD sowie die Breite des Synaptischen Spaltes bestimmt. Bis auf Letzteren war bei den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe keiner der Parameter signifikant verändert. Der Synaptische Spalt präsentierte sich an den Synapsen der Mutanten signifikant verschmälert.

Eine Gegenüberstellung dieser Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Publikationen ergibt Folgendes (s. Tab. 1):

Won et al., 2012 zeigen in ihrer Publikation, dass sich die Synapsendichte innerhalb der hippocampalen CA1 Region zwischen *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtypen nicht unterscheidet. Studien, die die PSD-Länge hippocampaler Synapsen untersuchten, kommen zu einem einheitlichen Ergebnis. Alle Analysen ergaben, dass in diesem Parameter kein Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Untersuchungsgruppe besteht. Die Vermessung der PSD Längen an striatalen Synapsen ergab eine signifikant reduzierte PSD-Länge in den *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Peca et al. 2011).

Mit den Ergebnissen zur PSD-Dicke verhält es sich ähnlich. Bis auf eine signifikant reduzierte PSD-Dicke in *Shank1*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Hung et al., 2008), bleiben alle weiteren Vergleiche der PSD-Dicke zwischen Mutanten und Kontrollgruppe im Hippocampus ohne signifikante Befunde. Bei Peca et al., 2011 ist die PSD-Dicke an den Synapsen des Striatums signifikant verschmälert.

Es fällt auf, dass unter all den Publikationen zur PSD-Analyse nur in einer die Dichte der Synapsen (Won et al., 2012) und in keiner einzigen die Breite des synaptischen Spaltes ermittelt wurden.

Die bisher veröffentlichten Studien kommen überwiegend, zu dem Ergebnis, dass in den PSD-Parametern kaum Unterschiede zwischen *Shank*-Mausmutanten und Wildtypen existieren. Anders als in den Studien zur Spineanalyse wurde für die PSD Analyse in allen Publikationen mit gleichem Material und mit gleicher Methodik gearbeitet. Diese Übereinstimmung in der experimentellen Vorgehensweise erhöht die Vergleichbarkeit der Daten.

Für einen Vergleich der Breite des Synaptischen Spaltes fehlt es an Daten anderer Publikationen.

Mit morphologischen Analysen der PF-PC Synapsen des Kleinhirns beschäftigten sich Baudouin et al., 2012. Ihr Autismus-Mausmodell trug allerdings einen Knockout für das *Neurologin3*-Gen. Zwischen den *Nlg3*-Mausmutanten und der Kontrollgruppe konnten sie keine signifikanten, morphologischen Unterschiede feststellen.

#### 4.2.1.2 Diskussion der einzelnen Parameter

##### 4.2.1.2.1 PSD-Dichte

Hinsichtlich der PSD-Dichte bestand in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied zwischen *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtypen. Anhand der Golgi-gefärbten Schnitte konnte bereits gezeigt werden, dass ein Verlust von Shank2 keine Auswirkungen auf die Spinedichte hat und Shank2 für diesen Parameter nicht von signifikanter Bedeutung ist. Kann man aufgrund der engen räumlichen Beziehung von Spines und PSDs diese Schlussfolgerung aus der Spineanalyse auf die Ergebnisse der PSD-Dichte übertragen?

Die Schlussfolgerung ließe sich nur dann anwenden, wenn die Bildung eines Spines auch immer synchron dazu die Bildung einer Synapse samt PSD innerhalb des Spines bedeutete. Die Literatur rät davon ab, bei der Bildung eines Spines automatisch auch von einer Synapsenbildung auszugehen und plädiert dafür, diese beiden Prozesse getrennt zu betrachten. Dafür liefert sie folgende Gründe:

Im Cerebellum durchgeführte Versuche beobachten, dass an Purkinjezellen morphologisch unauffällige Spines auch ohne eintreffende Axonterminale von Körnerzellen entstehen. Einem Großteil dieser Spines fehlt jedoch die Synapse als interneuronales Kommunikationsmittel (Yuste und Bonhoeffer, 2004).

Ethell und Yamaguchi, 1999 beobachteten in Zellkulturen, dass sich in manchen Zellsystemen Spines und Synapsen mit PSDs nicht zeitgleich entwickeln. Auch die jeweilige Entstehungsdauer der beiden morphologischen Gebilde spricht gegen das stets synchrone Auftreten von Spines und Synapsen. Spines können innerhalb von Minuten entstehen und ihre Form ändern, Synapsen brauchen lange Zeit, um sich zu entwickeln (Yuste und Bonhoeffer, 2004; Zhang und Benson, 2000).

Daneben existieren Modelle, die versuchen Ursprung und zeitlichen Zusammenhang von Spinogenese und Synaptogenese zu erklären. Keines dieser Modelle geht von einer zeitgleichen Bildung von Synapse samt PSD und Spine aus (Yuste und Bonhoeffer, 2004; J. Vaughn, 1989).

Trotz der unterschiedlichen Ansätze, die diese Theorien verfolgen, geht aus allen hervor, dass dort, wo sich ein Spine entwickelt hat, nicht zwingend auch eine PSD ausgebildet sein muss. Man kann daher nicht ohne weiteres davon ausgehen, dass aufgrund des fehlenden Einflusses von Shank2 auf die Spinedichte, dieses Protein auch auf die PSD-Dichte keinen Einfluss hat. Um den Einfluss von Shank2 auf die Bildung von PSDs und Synapsen abschätzen zu können, lohnt es sich daher, sich den Theorien über die Entstehung von Synapsen und den daran beteiligten Einflussgrößen explizit zu widmen. Der zugrunde liegende Gedanke dabei ist, dass der Stimulus, der zur Bildung von Synapsen führt, auch Einfluss auf die PSD-Dichte hat. Anhand der Modelle zur Einleitung und zum Ablauf der Synaptogenese soll überprüft werden, ob den Proteinen der PSD, einschließlich Shank2, eine Bedeutung für die Dichte von Synapsen beizumessen ist.

Vor allem durch elektronenmikroskopische Studien wurden bis heute mehrere Theorien und allgemeine Grundsätze zur Synaptogenese entworfen. Einen guten Überblick über die Theorien zur Synaptogenese bietet der Artikel von J. Vaughn, 1989:

Eine der Theorien beispielsweise geht davon aus, dass die Initiierung der Synapsenbildung auf der Seite der Präsynapse liegt. Die präsynaptische Membran gilt dabei als induzierendes Element. Postsynaptische Proteine, wie das Shank2-Protein, gelten in diesem Modell nicht als Initiatoren der Synapsenbildung und ihr Verlust hätte folglich keine Auswirkungen auf die Dichte von Synapsen.

Andere Forschungsgruppen halten den postsynaptischen Dendriten als das führende Element der Synaptogenese. Allerdings werden in dieser Theorie nicht die Proteine der PSD

als Trigger der Synaptogenese angesehen, sondern die in den Vesikeln enthaltenen Botenstoffe, die die Signale zur Akkumulation von Proteinen der PSD aussenden. Die Akkumulation und Verdichtung von Proteinen zu einer PSD ist demnach die Folge, nicht der Trigger einer Synapsenbildung. Aus dieser Sicht ist Shank2 für die Synapseninduktion und -dichte nicht von Bedeutung.

Neben dem Einfluss von Extrazellulärer Matrix wird auch in anderen Publikation die Synapsen-induzierende Kraft von aus Vesikeln freigesetzten Transmittern diskutiert.

Verschiedene Forschungsgruppen beobachteten in ihren Studien, dass für die Entstehung einer Synapse weder ein Aktionspotential noch spontane Neurotransmitterfreisetzungen notwendig sind (Zhang und Benson, 2000). Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass primär weder ein physikalischer Kontakt von Prä- und Postsynapse, noch eine funktionierende Signalkaskade innerhalb der Postsynapse Voraussetzung für die Entstehung einer Synapse sind. Diese Erkenntnis führt zu der Annahme, dass selbst wenn der Verlust des Shank2 Proteins zu einer gestörten Signalkaskade innerhalb der PSD führen sollte, keine Veränderung der Synapsendichte zu erwarten wäre.

Ziel der Recherche zu den Theorien der Synaptogenese war es, Hinweise zu erhalten, inwieweit die Proteine der PSD Einfluss auf die Bildung von Zellkontakten haben. In keinem der oben genannten Modelle werden die Proteine der PSD als Auslöser für die primäre Anlage von Synapsen angesehen. Aus dieser Sicht hat Shank2, als Protein der PSD, keinen Einfluss auf die Synapsendichte. Trifft diese Überlegung zu, so liefert sie vielleicht eine Erklärung dafür, warum in dieser Arbeit die Dichte der Synapsen in den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen nicht signifikant verändert war. Die Modelle zur Synaptogenese geben jedoch keinen Aufschluss darüber, inwieweit die Proteine der PSD für die Aufrechterhaltung, Reifung und vor allem Funktionstüchtigkeit der Synapsen notwendig sind.

Es ist möglich, dass der Beitrag, den Shank2 zur Aufrechterhaltung und Reifung von Synapsen liefert, nach dessen Wegfall von Shank1 übernommen wird. Dies könnte ein Grund dafür sein, warum selbst nach dem Shank2 Verlust in dieser Arbeit keine Veränderungen in der Synapsendichte festgestellt wurden.

#### 4.2.1.2.2 PSD-Länge

Wie schon die Dichte, war auch die Länge der PSDs zwischen WT und *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht signifikant verändert. Aus der Darstellung der kumulativen Häufigkeiten geht hervor, dass sogar das Vorkommen von langen und kurzen PSDs in den beiden Untersuchungsgruppen gleich verteilt war. Es stellt sich nun die Frage, woran es liegen könnte, dass der Verlust von Shank2 keine Auswirkungen auf die PSD-Länge der *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäuse hatte.

Grundsätzlich existieren zwei Faktoren, die dem Aufgabenfeld der Shankproteine zugeschrieben werden und die bei einem Verlust von Shankproteine zu einer Veränderung der PSD-Morphologie führen könnten. Zu diesen Faktoren zählen zum einen der Reifungsprozess von Synapsen und zum anderen organisatorische Umstrukturierungen innerhalb der PSD.

Verschiedene Publikationen schreiben den Shankproteinen eine Bedeutung für die Reifung von Synapsen zu (Roussignol et al., 2005; Grabrucker et al., 2011 ; Harris et al., 2016). Der Vorgang der Reifung und Entwicklung geht in der Regel mit morphologischen Veränderungen an Synapsen einher. Erfüllen die Shankproteine tatsächlich Aufgaben in diesen Reifungsprozessen, so müssten die Mutanten aufgrund des Verlustes von Shank2 eine höhere Dichte morphologisch abgrenzbarer, unreifer, Synapsen aufweisen.

Als verlässliche Anhaltspunkte, um die Reife einer Synapse zu bestimmen, gelten die Anzahl an synaptischen Vesikel an Prä- und Postsynapse sowie die Anzahl an Mitochondrien innerhalb der Präsynapse. Für die Länge und die Dicke der PSD sowie für die Breite des synaptischen Spaltes konnten jedoch keine messbaren Unterschiede während des Reifungsprozesses einer Synapse festgestellt werden. Für die Länge der PSD existieren quantitative morphologische Untersuchungen während der Reifung asymmetrischer Synapsen innerhalb einer Zellpopulation. Auch hier wurden keine Veränderungen des Parameters PSD-Länge festgestellt (Vaughn, 1989). Unreife und reife Synapsen weisen also keine merklichen Unterschiede in diesem Parameter auf. Daher ist davon auszugehen, dass in dieser Arbeit anhand der Länge der PSD keine Aussagen über die Reife der Synapsen getroffen werden können. Trotz der unveränderten PSD-Längen zwischen WT und *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen, kann es sich bei den Synapsen der Mutanten um unreife Synapsen handeln. Fazit der Überlegungen zur Synapsenreifung ist, dass sich die Länge der PSD während der Reifung von Synapsen nicht verändert und deshalb anhand der in dieser Arbeit gemessenen

Parameter keine Aussagen über den möglichen Einfluss von Shank2 auf die Reifung von Synapsen getroffen werden können.

Die andere Überlegung war, dass, aus dem Shank2 Verlust resultierende, organisatorische Umstrukturierungen innerhalb der PSD zu einer Änderung der PSD-Länge führen könnten. Dies ist so in den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht eingetroffen. Der Grund dafür könnte in der vertikalen, nicht horizontalen Anordnung und Organisation der PSD liegen. Wahrscheinlicher wäre es, dass ein Verlust der, in der dritten Schicht der PSD angeordneten Shank2-Proteine zu einer Reduktion der PSD-Dicke, nicht aber der PSD-Länge führt.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse der hier gewonnenen Daten nahe, dass Shank2 für die Länge der PSD eine zu vernachlässigende Rolle spielt.

#### 4.2.1.2.3 PSD-Dicke

Aufgrund der vertikalen Anordnung und Organisation der drei PSD-Schichten, von denen die dritte überwiegend aus Shank2-Proteinen besteht, ist bei einem Mangel an Shank2 am ehesten mit Auswirkungen auf den Parameter PSD-Dicke zu rechnen. Dennoch ergaben sich bei der Analyse von *Shank2*<sup>-/-</sup>- Mäusen und WT keine signifikanten Unterschiede. Warum sich die Dicke der PSD trotz Shank2 Verlustes stabil präsentiert, kann mehrere Gründe haben.

Da sich auch in den anderen PSD-Parametern keine Unterschiede feststellen ließen, ist es zunächst einmal sehr wahrscheinlich, dass Shank2 auch keinen Einfluss auf die Dicke der PSD hat.

Anderenfalls könnte eine kompensatorische Hochregulierung der Shank1-Proteinmenge den Verlust der Shank2-Proteine ausgeglichen haben.

Denkbar wäre auch, dass das Shank2-Defizit zwar zu Veränderung der Dichte, nicht aber zu Veränderungen der Dicke der dritten PSD-Schicht führt. Dies setzt voraus, dass die verbleibenden Shank1-Proteine, trotz des Verlustes der Shank2-Bindungspartner, die unterste PSD-Schicht als ein stabiles Gerüst aufrechterhalten. Das morphologische Korrelat dazu wäre eine PSD-Schicht geringerer Elektronendichte.

Auch eine andersgeartete Um- oder Neustrukturierung der PSD könnte eine Erklärung dafür liefern, warum sich ihre Dicke nach einem Shank2-Knockout nicht signifikant verändert. Wie auch im Fall einer Shank1-Kompensation, wäre es hierfür wegweisend, wie

die Zusammensetzung der PSD-Proteine zwischen *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtypen variiert. Auch eine funktionelle und morphologische Anpassung des Zytoskelettes an den Shank2-Verlust könnte zu einer Kompensation beitragen.

Treten in einem Experiment mögliche Unterschiede nicht ein, so ist auch die verwendete Methodik kritisch zu überdenken. Für diese Arbeit stellt sich dabei die Frage, ob das Auflösungsvermögen der Elektronenmikroskopie ausreicht, um eventuell vorhandene, minimale, aber bestehende Unterschiede zwischen *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen und WT darzustellen. Die gemessenen Distanzen der analysierten Parameter betragen zwischen 15-400nm. Die Auflösung des hier verwendeten TEM liegt bei 0,5nm. Shankproteine repräsentieren 5% der PSD-Proteine (Sugiyama et al., 2005). Bei einer durchschnittlichen PSD-Dicke der WT von 25,66 nm bedeutete der Verlust eines 1/20 der Proteine eine Reduktion um 1,88 nm. Unterschiede dieser Größenordnung ließen sich mit dem TEM darstellen. Allerdings ist nicht klar, ob diese Überlegung so auf den Verlust der Shank2-Proteine an den PF-PC Synapsen angewendet werden kann. Es ist daher nicht auszuschließen, dass aufgrund mangelnder Auflösung bestehende Unterschiede nicht erfasst werden.

#### 4.2.1.2.4 Breite des Synaptischen Spaltes

Um die Analysen in der Molekularschicht abzuschließen gilt es als letzten Parameter, die Ergebnisse zur Breite des synaptischen Spaltes zu bewerten.

Die durchschnittliche Breite eines synaptischen Spaltes an chemischen Synapsen beträgt 20-40 nm (Kandel et al., 2013). Um für die PSD Analysen ein einheitliches Kollektiv zu erhalten, wurden ausschließlich Synapsen mit einem Spalt größer 15 nm in die Analysen miteinbezogen. Die Auswertung der Daten ergab in der Gruppe der *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäuse einen signifikant schmälere synaptischen Spalt.

Können diese schmalen synaptischen Spalte als Folge des *Shank2*-Knockouts gedeutet werden?

Shank2 steht zwar nicht in direktem Kontakt mit Proteinen des synaptischen Spaltes, die extreme Vernetzung aller PSD-Bestandteile untereinander und bis zu den Kanälen des synaptischen Spaltes erklärt jedoch, warum die Proteine der PSD nicht nur als einzelne Strukturen sondern immer auch im Kontext ihrer Verbindungen zu beurteilen sind.

Shankproteine binden indirekt an Neuroligine. Neuroligine sind eine Gruppe von Proteinen, die der Postsynapse entstammen. Zusammen mit der, der Präsynapse entspringenden Proteinfamilie der Neurexine überspannen sie den synaptischen Spalt und sind dabei miteinander verankert (Grabrucker et al., 2011; Südhof et al., 2006).

Möglicherweise ist die geringere Breite des Synaptischen Spaltes der *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäuse ein Hinweis dafür, dass die Auswirkungen eines Shank2-Verlustes nicht nur in Modulationen der PSD selbst zu suchen sind, sondern auch in Veränderungen des unmittelbaren Umfeldes resultieren können. Da diese Überlegung in der Literatur bisher kaum thematisiert wurde, müsste ihr zunächst durch weitere Untersuchungen, die auch detaillierte Analyse des synaptischen Spaltes beinhalten müssten, nachgegangen werden.

#### 4.2.2 PSD-Analyse in der Körnerzellschicht

Beim Vergleich der Synapsen in der Körnerzellschicht zwischen *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mäusen und WT wurde wie bei der PSD-Analyse in der Molekularschicht verfahren. Auch hier wurden die Parameter PSD-Dichte, -Länge und -Dicke, sowie die Breite des synaptischen Spaltes bestimmt.

Anhand der hier erhobenen Daten ergaben sich in keinem der gemessenen Parameter signifikante Unterschiede zwischen den *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mutanten und der Kontrollgruppe. Ein Vergleich dieser Daten mit den Publikationen, die sich ebenfalls mit der PSD-Analyse in *Shank*-Mausmodellen befassten, erfolgte bereits bei der Diskussion der PSD-Analyse in der Molekularschicht.

Da sich die Diskussionspunkte und Überlegungen zu den einzelnen Parametern zum Großteil mit den Untersuchungen der *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäuse in der Molekularschicht decken, sollen hier nur noch speziell die Körnerzellschicht betreffende Überlegungen aufgeführt werden.

#### 4.2.2.1 PSD-Parameter

Der offensichtliche Unterschied zu den Untersuchungen der Molekularschicht besteht in der Analyse einer neuen Cortexregion und im Knockout eines anderen Shankproteins. Von den *SHANK* Genen ist *SHANK3* am engsten mit dem Auftreten von Autismus verknüpft.

Die Expression von Shank3 in der Körnerzellschicht fällt deutlich geringer aus als die Expression von Shank2 in der Molekularschicht (Peca et al., 2011). Wang et al., 2014 fanden heraus, dass im Cerebellum vor allem die Isoformen Shank3c und Shank3d exprimiert werden und deren Level im erwachsenen Kleinhirn konstant gehalten werden.

Der Verlust der normalerweise weitaus höheren Shank2 Konzentration an den Synapsen der Molekularschicht hinterließ keine messbaren morphologischen Auswirkungen. Daher überrascht es nicht, dass auch der Verlust der vergleichsweise geringeren Shank3 Konzentration an den Körnerzellsynapsen keine Veränderungen der PSD-Parameter bewirkt.

Geht man davon aus, dass kompensatorische Vorgänge zu der unauffälligen Morphologie der Synapsen führen, könnte wie in der Molekularschicht auch hier das an der Synapse verbliebene Shank1- und die Shank3-Isoformen die entstandenen Defizite ausgeglichen haben.

Des Weiteren unterscheiden sich die Synapsen der Körnerzellschicht von denen der Molekularschicht in der Lokalisation und in dem neuronalem Input, den sie empfangen. Als erste Zellpopulation im Cerebellum erhalten die Körnerzellen Informationen aus dem Hirnstamm und Rückenmark. Auch das Milieu, das die MF-GC Synapse in Form eines Glomerulus umgibt ist einzigartig innerhalb des Kleinhirns. Inwieweit zelluläre Umgebung und neuronaler Input die Morphologie einer Shank-defizitären Synapse mitbeeinflussen können, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden.

Insgesamt existieren kaum morphologische Untersuchungen zu den Synapsen der Körnerzellen. Dies mag daran liegen, dass diese Synapsen schwerer darzustellen sind.

### 4.2.3 Zusammenfassung der Erkenntnisse aus den PSD-Analysen

Die PSD-Analyse in *Shank2*<sup>-/-</sup>- und *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mäusen ergab, bis auf den signifikant schmälere synaptischen Spalt in den *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäusen keine signifikanten Abweichungen in den bestimmten Parametern. Zum einen können durch das Shankdefizit induzierte Kompensationsmechanismen der verbleibenden PSD-Proteine zu dem unauffälligen Befund geführt haben. Zum anderen liegt es aufgrund der überwiegend nicht signifikanten Ergebnisse nahe, dass die Shankproteine keinen Einfluss auf die hier bestimmten morphologischen Parameter nehmen. Die schmalen synaptischen Spalte der *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäuse können als Folge von Präparatschnittführungen, oder als Auswirkungen der fehlenden indirekten Verknüpfung von Shankproteinen und Neuroliginen interpretiert werden.

## 5 Zusammenfassung

Der Zusammenhang zwischen einer Mutation in den *SHANK* Genen und dem Auftreten von Autismus ist in zahlreichen Studien gezeigt worden. In *Shank*-Mausmodellen und in Zellkulturen wurden Versuche unternommen, um die Pathogenese dieser neuronalen Entwicklungsstörung besser zu verstehen.

In den Analysen fielen die Mutanten regelmäßig durch autistische Verhaltensweisen und gestörte synaptische Übertragung sowie ein fehlerhaftes Signalling an den Membranrezeptoren auf. Synapsen und Spines stellen morphologische Korrelate synaptischer Übertragung dar. Mutationsbedingte Veränderungen dieser Strukturen waren daher in *Shank*<sup>-/-</sup>-Mäusen vorstellbar. Auch aufgrund der Vernetzung, der Lokalisation und dem hohen Aufkommen von Shankproteinen an Synapsen lag die Vermutung nahe, dass ein Verlust von Shankproteinen zu morphologische Veränderungen von Spines und Synapsen führt. Der Gedanke hinter den morphologischen Analysen war, dass auf der Grundlage möglicher Veränderungen neue Erkenntnisse für die Bedeutung und das Aufgabenfeld der Shankproteine gewonnen werden könnten.

Diese Idee verfolgte auch die hier vorliegende Arbeit. Im Cortex des Kleinhirns wurden Spines und Postsynaptische Dichten von *Shank2*<sup>-/-</sup>- und *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mäusen anhand verschiedener Parameter analysiert und jeweils mit einer Kontrollgruppe verglichen. Die Analysen lieferten, bis auf signifikant verschmälerte synaptische Spalte in der Gruppe der *Shank2*<sup>-/-</sup>-Mäuse, keine signifikanten Unterschiede. Bei der Analyse der *Shank3*<sup>-/-</sup>-Mäuse ergaben sich in keinem Parameter signifikante Abweichungen.

Die geringen Unterschiede zwischen den Mutanten und den Wildtypen deuten darauf hin, dass die Shankproteine Shank2 und Shank3 weder auf die Dichte, noch auf die Morphologie von cerebellären Synapsen und Spines einen messbaren Einfluss haben. Die funktionellen Defizite scheinen nicht in sichtbaren morphologischen Veränderungen zu resultieren. Auch die starke Vernetzung der Shankproteine innerhalb der Postsynaptischen Dichte führt nach einem Shank-Verlust nicht zu Abweichungen in der Morphologie cerebellärer Postsynaptischer Dichten. Aus den Daten dieser Arbeit geht hervor, dass die Shankproteine keine wesentliche Rolle für die Morphologie von Synapsen spielen. Die in den Mauslinien erhobenen funktionellen Defizite schreiben den Shankproteinen jedoch eine funktionelle Bedeutung für die Signalübertragung zu.

Trotz der wenigen und geringen, erfassten Unterschiede zwischen *Shank*-Mutanten und Wildtypen lässt sich nicht ausschließen, dass Shankproteine die Morphologie von Synapsen und Spines beeinflussen. Der Grund, weshalb ein *Shank*-Knockout keine zu fassbaren Auswirkungen zeigt, könnte an, zum Untersuchungszeitpunkt bereits abgelaufenen Kompensationsprozessen und Umstrukturierungen sowie dynamischen Prozessen des synaptischen Umfeldes liegen, die mit einem statischen Imaging nicht erfasst werden können. Morphologische Analysen mithilfe von Life Imaging Verfahren ermöglichen es, auch die dynamische Komponente der untersuchten neuronalen Strukturen in die Beurteilung miteinzubeziehen.

Für detaillierte und fundierte Aussagen über den Zusammenhang von Shankproteinen und der cerebellären synaptischer Morphologie fehlt es an vergleichbaren Studien, die sich in ähnlicher Methodik und Vorgehensweise, mit den Auswirkungen von *Shank*-Knockouts im Kleinhirn beschäftigen.

In weiterführenden Untersuchungen wäre es interessant, anhand der Anzahl synaptischer Vesikel dem Einfluss von Shankproteinen auf die Reifung von Synapsen nachzugehen. Bereits an Tag 21 postnatal, dem Tag größter Shankexpression während der neuronalen Entwicklung, mit den morphologischen Analysen in Gehirnschnitten zu beginnen und diese in regelmäßigen Altersabständen weiterzuführen, könnte Hinweise über möglicherweise ablaufende Kompensationsprozesse an den Synapsen der *Shank*<sup>-/-</sup>-Mäuse liefern.

Die Frage nach dem Einfluss und der Bedeutung der Shankproteine für die Morphologie von Synapsen und Spines konnte auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Die erhobenen Daten legen einen insgesamt geringen Einfluss der Shankproteine auf die verschiedenen morphologischen Parameter im Cerebellum nahe. Dies bedeutet aber nicht, dass sich dieses Ergebnis so auch bei der Analyse einer anderen Hirnregion oder in Gehirnschnitten jüngerer Mäuse oder anderer *Shank*<sup>-/-</sup>-Mausmodelle reproduzieren ließe.

So heterogen, wie sich die Symptomkonstellationen autistischer Erkrankungen präsentieren, so verschieden scheinen die ihnen zugrundeliegenden, pathologischen Mechanismen zu sein. In dieser Heterogenität und der fehlenden direkten Vergleichbarkeit der autistischen Ausprägungen liegt die große Herausforderung der Erforschung ihrer zugrundeliegenden Pathologie.

## 6 Literaturverzeichnis

(1)Amaral, David G.; Schumann, Cynthia M.; Nordahl, Christine W. (2008): Neuroanatomy of autism. *Trends in neurosciences* 31, S. 137-145

(2)Baudouin, Stephane J.; Gaudias, Julien; Gerharz, Stefan; Hatstatt, Laetitia; Zhou, Kuikui; Punnakkal, Pradeep, Tanaka, Kenji F.; Spooren, Will; Hen, Rene; De Zeeuw, Chris I.; Vogt, Kaspar; Scheiffele, Peter (2012): Shared synaptic pathophysiology in syndromic and nonsyndromic rodent models of autism. *Science* 338, S. 128-132

(3)Berkel, Simone; Marshall, Christian R.; Weiss, Birgit; Howe, Jennifer; Roeth, Ralph; Moog, Ute; Endris, Volker; Roberts, Wendy; Szatmari Peter; Pinto, Dalila; Bonin, Michael; Riess, Angelika; Engels, Hartmut; Sprengel, Rolf; Scherer, Stephen W., Rappold, Gudrun A. (2010): Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nature genetics* 42, S.489-491

(4)Boeckers, Tobias M.; Segger-Junius, Mailin; Iglauer, Peter; Bockmann, Jurgen; Gundelfinger, Eckart D.; Kreutz, Michael R.; Richter Dietmar; Kindler, Stefan; Kreienkamp, Hans-Jürgen (2004): Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3' untranslated region of Shank1 mRNA. *Molecular and cellular neurosciences* 26, S. 182–190

(5)Boeckers, Tobias M.; Kreutz, Michael R.; Winter, Carsten; Zuschratter, Werner; Smalla, Karl-Heinz; Sanmarti-Vila, Lydia; Wex, Heike; Langnaese, Kristina; Bockmann Jürgen; Garner, Craig C.; Gundelinger, Eckart D. (1999): Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, S. 6506–6518

(6)Bonaglia, Maria C.; Giorda, Roberto; Borgatti, Renato; Felisari, Giorgio; Gagliardi, Chiara; Selicorni, Angelo; Zuffardi, Orsetta (2001): Disruption of the ProSAP2 gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 deletion syndrome. *American journal of human genetics* 69, S. 261–268

(7)Bozdagi, Ozlem; Sakurai, Takeshi; Papapetrou, Danae; Wang, Xiaobin; Dickstein, Dara L.; Takahashi, Nagahide; Kajiwarra, Yuji; Yang, Mu; Katz , Adam M.; Scattoni, Maria L.; Harris,

Mark J.; Saxena, Roheeni; Silverman, Jill L.; Crawley, Jacqueline N.; Zhou, Qiang; Hof, Patrick R., Buxbaum, Joseph D. (2010): Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Molecular autism* 1, S. 1-15

(8)Durand, Christelle M.; Betancur, Catalina; Boeckers, Tobias M.; Bockmann, Juergen; Chaste, Pauline; Fauchereau, Fabien; Nygren, Gudrun; Rastam, Maria; Gillberg, Carina; Anckarsäter, Henrik; Sponheim, Eili; Goubran-Botros, Hany; Delorme, Richard; Chabane, Nadia; Mouren-Simeoni, Marie-Christine; De Maas, Philippe; Bieth, Eric; Rogé, Bernadette; Herón, Delphine; Burglen, Lydie; Gillberg, Christopher; Leboyer, Marion; Bourgeron, Thomas (2007): Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nature genetics* 39, S. 25–27

(9)Engert, Florian; Bonhoeffer, Tobias (1999): Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, S. 66–70

(10)Ethell, Iryna M.; Yamaguchi, Yu (1999): Cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 induces the maturation of dendritic spines in rat hippocampal neurons. *The Journal of cell biology* 144, S. 575–586

(11)Gauthier, Julie; Spiegelman, Dan; Piton, Amelie; Lafreniere, Ronald G.; Laurent, Sandra; St-Onge, Judith, Lapointe, Line; Hamdan, Fadi F.; Cossette, Patrick; Mottron, Laurent; Fombonne, Éric; Joober, Ridha; Marineau, Claude; Drapeau, Pierre; Rouleau, Guy A. (2009): Novel de novo SHANK3 mutation in autistic patients. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 150B, S. 421–424

(12)Grabrucker, Andreas M. (2012): Environmental factors in autism. In: *Frontiers in psychiatry* 3, S. 118-131

(13)Grabrucker, Andreas M.; Knight, Mary J.; Proepper, Christian; Bockmann, Juergen; Joubert, Marisa; Rowan, Magali; Nienhaus, Ulrich G.; Garner, Craig C.; Bowie, Jim U.; Kreutz, Michael R.; Gundelfinger, Eckart D.; Boeckers, Tobias M. (2011): Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation. *The EMBO journal* 30, S. 569–581.

- (14) Grabrucker, Andreas M.; Schmeisser, Michael J.; Schoen, Michael; Boeckers, Tobias M. (2011): Postsynaptic ProSAP/Shank scaffolds in the cross-hair of synaptopathies. *Trends in cell biology* 21, S. 594–603
- (15) Grabrucker, Stefanie; Jannetti, Linda; Eckert, Matti; Gaub, Simone; Chhabra, Resham; Pfaender, Stefanie; Mangus, Katharina; Parameshwar, Pasham R.; Rankovic, Vladan; Schmeisser, Michael J.; Kreutz, Michael R.; Ehret, Günter; Boeckers, Tobias M.; Grabrucker, Andreas M. (2014): Zinc deficiency dysregulates the synaptic ProSAP/Shank scaffold and might contribute to autism spectrum disorders. *Brain : a journal of neurology* 137, S. 137–152
- (16) Han, Kihoon; Holder, J. Lloyd, JR; Schaaf, Christian P.; Lu, Hui; Chen, Hongmei; Kang, Hyojin; Tang, Jianrong; Wu, Zhenyu; Hao, Shuang; Cheung, Sau Wai; Yu, Peng; Sun, Hao; Breman, Amy M.; Patel, Ankita; Lu, Hui-Chen; Zoghbi, Huda Y. (2013): SHANK3 overexpression causes manic-like behaviour with unique pharmacogenetic properties. *Nature* 503, S. 72–77
- (17) Harris, Kathryn P.; Akbergenova, Yulia; Cho, Richard W.; Baas-Thomas, Maximilien S.; Littleton, J. Troy (2016): Shank Modulates Postsynaptic Wnt Signaling to Regulate Synaptic Development. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 36, S. 5820–5832
- (18) Huguet, Guillaume; Ey, Elodie; Bourgeron, Thomas (2013): The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *Annual review of genomics and human genetics* 14, S. 191–213.
- (19) Hung, Albert Y.; Futai, Kensuke; Sala, Carlo; Valtschanoff, Juli G.; Ryu, Jubin; Woodworth, Mollie A.; Kidd, Fleur L.; Sung, Clifford C.; Miyakawa, Tsuyoshi; Bear, Mark F.; Weinberg, Richard J.; Sheng, Morgan (2008): Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, S. 1697–1708.
- (20) Jiang, Yong-Hui; Ehlers, Michael D. (2013): Modeling autism by SHANK gene mutations in mice. *Neuron* 78, S. 8–27
- (21) Frith, Uta; Happé, Francesca G.; Amaral, David G.; Warren, Stephen T.: Autism and other neurodevelopmental disorders affecting cognition. In: Kandel, Eric R.; Schwartz,

James H.; Jessell, Thomas M.; Siegelbaum, Steven A.; Hudspeth, Albert J. (Hrsg.) *Principles of neural science*. 5. ed., McGraw-Hill Medical (NY), S. 1425-1440 (2013)

(22)Lisberger, Stephen G.; Thach, Thomas W.: The Cerebellum. In: Kandel, Eric R.; Schwartz, James H.; Jessell, Thomas M.; Siegelbaum, Steven A.; Hudspeth, Albert J. (Hrsg.) *Principles of neural science*. 5. ed., McGraw-Hill Medical (NY), S. 960-981 (2013)

(23)Siegelbaum, Stephen A.; Kandel, Eric R.: Synaptic Transmission. In: Kandel, Eric R.; Schwartz, James H.; Jessell, Thomas M.; Siegelbaum, Steven A.; Hudspeth, Albert J. (Hrsg.) *Principles of neural science*. 5. ed., McGraw-Hill Medical (NY), S. 177-188 (2013)

(24)Kim, Seon-Myung; Choi, Kyu Yeong; Cho, In Ha; Rhy, Jin Hee; Kim, Sung Hyun; Park, Chul-Seung; Kim, Eunjoon; Song, Woo Keun (2009): Regulation of dendritic spine morphology by SPIN90, a novel Shank binding partner. *Journal of neurochemistry* 109, S. 1106–1117

(25)Kouser, Mehreen; Speed, Haley E.; Dewey, Colleen M.; Reimers, Jeremy M.; Widman, Allie J.; Gupta, Natasha; Liu, Shunan; Jaramillo, Thomas C.; Bangash, Muhammad; Xiao, Bo; Worley, Paul F.; Powell, Craig M. (2013): Loss of predominant Shank3 isoforms results in hippocampus-dependent impairments in behavior and synaptic transmission. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 33, S. 18448–18468

(26)Lee, Kea Joo; Jung, Joon Goo; Arii, Tatsuo; Imoto, Keiji; Im Rhyu, Joo (2007): Morphological changes in dendritic spines of Purkinje cells associated with motor learning. *Neurobiology of learning and memory* 88, S. 445–450

(27)Lim, S.; Naisbitt, S.; Yoon, J.; Hwang, J. I.; Suh, P. G.; Sheng, M.; Kim, E. (1999): Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing, and differential expression in brain and development. *The Journal of biological chemistry* 274, S. 29510–29518

(28)Peca, Joao; Feliciano, Catia; Ting, Jonathan T.; Wang, Wenting; Wells, Michael F.; Venkatraman, Talaignair N.; Lascola, Christopher D.; Fu, Zhanyan; Feng, Guoping (2011): Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 472, S. 437–442

(29)Peter, Sasa; Brinke, Michiel M.; Stedehouder, Jeffrey; Reinelt, Claudia M.; Wu, Bin; Zhou, Haibo; Zhou, Kuikui; Boele, Henk-Jan; Kushner, Steven A.; Lee, Min Goo; Schmeisser,

Michael J.; Boeckers, Tobias M.; Schonewille, Martijn; Hoebeek, Freek E.; De Zeeuw, Chris I.

(30) Roussignol, Gautier; Ango, Fabrice; Romorini, Stefano; Tu, Jian Cheng; Sala, Carlo; Worley, Paul F.; Bockaert, Joël; Fagni, Laurent (2005): Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, S. 3560–3570

(31) Sala, Carlo.; Piëch, Valentin.; Wilson, Nathan R.; Passafaro, Maria; Liu, Guosong; Sheng, Morgan (2001): Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* 31, S. 115–130

(32) Schmeisser, Michael J.; Ey, Elodie; Wegener, Stephanie; Bockmann, Juergen; Stempel, A. Vanessa; Kuebler, Angelika; Janssen, Anna-Lena; Udvardi, Patrick T.; Shiban, Ehab; Spilker, Christina, Balschun, Detlef; Skryabin, Boris V.; tom Dieck, Susanne; Smalla, Karl-Heinz; Montag, Dirk; Leblond, Claire S.; Faure, Philippe; Torquet, Nicolas; Le Sourd, Anne-Marie; Toro, Roberto; Grabrucker, Andreas M.; Shoichet, Sarah A.; Schmitz, Dietmar; Kreutz, Michael, R.; Bourgeron, Thomas; Gundelfinger, Eckart D.; Boeckers, Tobias M. (2012): Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature* 486, S. 256–260

(33) Sheng, Morgan; Kim, Eunjoon (2000): The Shank family of scaffold proteins. *Journal of cell science* 113, S. 1851–1856

(34) Silverman, Jill L.; Turner, Sarah M.; Barkan, Charlotte L.; Tolu, Seda S.; Saxena, Roheeni; Hung, Albert Y. et al. (2011): Sociability and motor functions in Shank1 mutant mice. In: *Brain research* 1380, S. 120–137. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.09.026.

(35) Südhof, Thomas C. (2008): Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455, S. 903–911

(36) Sugiyama, Yoshiko; Kawabata, Izumi; Sobue, Kenji; Okabe, Shigeo (2005): Determination of absolute protein numbers in single synapses by a GFP-based calibration technique. *Nature methods* 2, S. 677–684

(37) Sungur, A. Ozge; Vorckel, Karl J.; Schwarting, Rainer K. W.; Wöhr, Markus (2014): Repetitive behaviors in the Shank1 knockout mouse model for autism spectrum disorder:

developmental aspects and effects of social context. *Journal of neuroscience methods* 234, S. 92–100

(38)Uppal, Neha; Puri, Rishi; Yuk, Frank; Janssen, William G. M.; Bozdagi-Gunal, Ozlem; Harony-Nicolas, Hala; Dickstein, Dara L.; Buxbaum, Joseph D.; Hof, Patrick R. (2015): Ultrastructural analyses in the hippocampus CA1 field in Shank3-deficient mice. *Molecular autism* 6, S. 41

(39)Vaughn, James E. (1989): Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. *Synapse* 3, S. 255–285

(40)Verpelli, Chiara; Schmeisser, Michael J.; Sala, Carlo; Boeckers, Tobias M. (2012): Scaffold proteins at the postsynaptic density. *Advances in experimental medicine and biology* 970, S. 29–61

(41)Vicidomini, Cinzia.; Ponzoni, Luisa; Lim, Dmitry; Schmeisser, Michael J.; Reim, Dominik; Morello, Noemi; Orellana, Daniel; Tozzi, Alessandro; Durante, Valentina.; Scalmani, Paolo; Mantagezza, Massimo; Genazzani, Armando A.; Giustetto, Maurizio; Sala, Mariaelvina; Calabresi, Paolo; Boeckers, Tobias M.; Sala, Carlo; Verpelli, Chiara (2016): Pharmacological enhancement of mGlu5 receptors rescues behavioral deficits in SHANK3 knock-out mice. *Molecular psychiatry*, S 1-14

(42)Wang, Xiaoming; McCoy, Portia A.; Rodriguiz, Ramona M.; Pan, Yanzhen; Je, H. Shawn; Roberts, Adam C.; Kim, Caroline J.; Berrios, Janet; Colvin, Jennifer S.; Bousquet-Moore, Danielle; Lorenzo, Isabel; Wu, Gangyi; Weinberg, Richard J.; Ehlers, Michael D.; Philpot, Benjamin D.; Beaudet, Arthur L.; Wetsel, William C.; Jiang, Yong-Hui (2011): Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. *Human molecular genetics* 20, S. 3093–3108

(43)Wang, Xiaoming; Xu, Qiong; Bey, Alexandra L.; Lee, Yoonji; Jiang, Yong-Hui (2014): Transcriptional and functional complexity of Shank3 provides a molecular framework to understand the phenotypic heterogeneity of SHANK3 causing autism and Shank3 mutant mice. *Molecular autism* 5, S. 30-44

(44)Wei, Hongen; Dobkin, Carl; Sheikh, Ashfaq M.; Malik, Mazhar; Brown, W. Ted; Li, Xiaohong (2012): The therapeutic effect of memantine through the stimulation of synapse

formation and dendritic spine maturation in autism and fragile X syndrome. *PloS one* 7, S. e36981

(45)Wöhr, Markus; Roulet, Florence I.; Hung, Albert Y.; Sheng, Morgan; Crawley, Jacqueline N. (2011): Communication impairments in mice lacking Shank1: reduced levels of ultrasonic vocalizations and scent marking behavior. *PloS one* 6, S. e20631

(46)Won, Hyejung; Lee, Hye-Ryeon; Gee, Heon Yung; Mah, Won; Kim, Jae-Ick; Lee, Jiseok; Ha, Seungmin; Chung, Changuk; Jung, Eun Suk; Cho, Yi Sul; Park, Sae-Geun; Lee, Jung-Soo; Lee, Kyungmin; Bae, Yong Chul; Kaang, Bong-Kiun; Lee, Min Goo; Kim, Eunjoon (2012): Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. *Nature* 486, S. 261–265

(47)Yuste, Rafael; Bonhoeffer, Tobias (2004): Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature reviews. Neuroscience* 5, S. 24–34

(48)Zhang, W.; Benson, D. L. (2000): Development and molecular organization of dendritic spines and their synapses. *Hippocampus* 10, S. 512–526

(49)Zhu, Li; Wang, Xiaoming; Li, Xin-Lei; Towers, Aaron; Cao, Xinyu; Wang, Ping; Bowman, Rachel; Yang, Hyuna; Goldstein, Jennifer; Li, Yi-Ju; Jiang, Yong-Hui (2014): Epigenetic dysregulation of SHANK3 in brain tissues from individuals with autism spectrum disorders. *Human molecular genetics* 23, S. 1563–1578

## Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

## Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.