**Aus dem Institut Anatomie und Zellbiologie**

**der Universität Ulm**

**unter Leitung von Prof. Dr. Tobias M. Böckers**

# Morphologische Analyse dendritischer Spines in verschiedenen Hirnregionen von *Shank2/Shank3*-Mausmutanten mit Hilfe der Golgi-Färbetechnik

## Dissertation

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

von

**Melissa Schaaff**

geboren in Mannheim

vorgelegt 2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Tobias Böckers

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Knöll

Tag der Promotion: 19.10.2017

***Meinen lieben Großeltern Otto und Friederike Hartmann.***

# Inhaltsverzeichnis

**Abkürzungsverzeichnis ..... V**

**1. Einleitung ..... 1**

1.1 Autismus-Spektrum-Störungen ..... 1

1.2 Mausmodelle für Autismus-Spektrum-Störungen ..... 2

1.3. Morphologische Analyse synaptischer Kontakte ..... 3

1.4 PROSAP/SHANK-Proteinfamilie ..... 5

1.5 Spineanalyse in Shank-Mutanten ..... 13

1.6 Zielsetzung der Arbeit ..... 16

**2. Material und Methoden ..... 18**

2.1 Material ..... 18

2.2 Methoden ..... 18

**3. Ergebnisse ..... 26**

3.1 Morphologische Analyse definierter Hirnregionen des Shank2/Shank3-DKOs im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen ..... 26

**4. Diskussion ..... 48**

4.1 Spinedichte ..... 48

4.2 Spinelänge ..... 50

4.3 Spinebreite ..... 51

4.4 Schlussfolgerung ..... 53

**5. Zusammenfassung ..... 56**

**6. Literaturverzeichnis ..... 58**

**Danksagung ..... 65**

**Lebenslauf ..... 66**

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| **ASD** | Autism Spectrum Disorder(s) |
| **ASS** | Autismus-Spektrum-Störung |
| **Abp1** | actin binding protein 1 (Aktin-bindendes Protein 1) |
| **AMPA** | alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid |
| **Ank** | Ankyrin |
| **Cort** | Cortactin binding site (Cortactin-bindende Stelle) |
| **CA** | Cornu ammonis (Ammonshorn) |
| **$Ca^{2+}$** | Calcium-Ion |
| **DKO** | Doppel-Knockout |
| **DLS** | Dorsolaterales Striatum |
| **DMS** | Dorsomediales Striatum |
| **DSM-V** | Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Auflage 5 |
| **GKAP** | Guanylate Kinase-Associated Protein<br>(Guanylat-Kinase-assoziiertes Protein) |
| **GluRδ2** | Glutamatrezeptor δ2 |
| **Hbs** | Homer binding site (Homer bindende Stelle) |
| **$IP_3R$** | Inositoltriphosphat-Rezeptor |
| **KO** | Knockout |
| **LTD** | Long term depression (Langzeit-Depression) |
| **LTP** | Long term potentiation (Langzeit-Potenzierung) |
| **mGluR** | metabotroper Glutamatrezeptor |
| **ml** | Milliliter |
| **µm** | Mikrometer |
| **MSN** | Medium Spiny Neuron |

| | |
|---|---|
| **NMDA** | N-methyl-D-aspartat |
| **n. s.** | nicht signifikant |
| **PDZ-Domäne** | PSD-95/DLG-/ZO1-Domäne |
| **PROSAP** | proline-rich synapse-associated protein |
| **PSD** | Postsynaptische Dichte |
| **PSD-95** | Postsynaptisches Dichteprotein-95 |
| **PTEN** | Phosphatase and tensin homolog |
| **P(n)** | Postnataler Tag (n), wobei n die Anzahl der Tage bedeutet |
| **SAM-Domäne** | Sterile alpha motif-Domäne |
| **SEM** | standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes) |
| **SHANK** | SH3 domain and ankyrin repeat-containing protein |
| ***Shank2*$^{-/-}$** | Homozygote *Shank2*-Mausmutante |
| ***Shank2* Δex7** | *Shank2*-Mausmutante mit Deletion von Exon 7 |
| ***Shank2* Δ*ex6-7*** | *Shank2*-Mausmutante mit Deletion von Exon 6 und 7 |
| ***Shank2* Δex6-7$^{-/-}$** | *Shank2*-Mausmutante mit Deletion von Exon 6 und 7 |
| ***Shank3αβ*$^{-/-}$** | Homozygote *Shank3αβ*-Mausmutante |
| **SH3-Domäne** | Scr homology 3-Domäne |
| **TSC1** | Tuberous sclerosis protein 1 (Hamartin) |
| **TSC2** | Tuberous sclerosis protein 2 (Tuberin) |
| **WT** | Wildtyp |
| **$Zn^{2+}$** | Zink-Ion |
| ↓ | Reduktion |
| ↑ | Zunahme |
| ↔ | Keine Veränderung |

# 1. Einleitung

## 1.1 Autismus-Spektrum-Störungen

Autismus-Spektrum-Störungen (ASS oder ASD für „Autism Spectrum Disorders“) gehören nach DSM-V, dem aktuellen Klassifikationssystem der American Psychiatric Association für psychiatrische Erkrankungen, zu den neuronalen Entwicklungsstörungen, welche sich in der Regel bereits in der frühen Kindheit bemerkbar machen. Nach DSM-V wird die einheitliche Diagnose der „Autismus-Spektrum-Störung“ aufgeführt. Als diagnostische Kriterien werden Defizite in der sozialen Interaktion und Kommunikation, sowie repetitive und stereotype Verhaltensweisen herangezogen (American Psychiatric Association 2013). Weitere häufig auftretende Komorbiditäten der ASD, welche jedoch im Rahmen des DSM-V-Klassifikationssystems nicht weiter aufgeführt werden, sind z.B. Schlaf- und Angststörungen, Epilepsie, Hyperaktivität sowie mentale Retardierung (Goldstein u. Schwebach 2004; Simonoff et al. 2008). Aktuell liegt die weltweite Prävalenz der ASD bei etwa 1 % der Allgemeinbevölkerung, wobei das männliche Geschlecht deutlich häufiger betroffen ist als das weibliche Geschlecht (Baird et al. 2006).

Aufgrund hoher Konkordanzraten bei monozygoten Zwillingen scheint der genetische Einfluss im Rahmen der ASD eine große Rolle zu spielen, wobei aktuellen Untersuchungen zufolge neben genetischen Einflüssen auch Umwelteinflüsse in Zusammenhang mit der Genese der ASD zu stehen scheinen (Hallmayer et al. 2011). Unter derartigen Umwelteinflüssen sind Risikofaktoren zu verstehen, welche sich durch die Lebensbedingungen und –verhältnisse der erkrankten Person ergeben, wie beispielsweise das Alter der Eltern zum Zeitpunkt der Geburt des an ASD erkankten Kindes (Durkin et al. 2008).

Die genetischen Ursachen der ASD sind vielfältig. So sind aktuell bereits eine Vielzahl an verschiedenen ASD-assoziierten Genmutationen bekannt (Moreno-De-Luca et al. 2013; Devlin u. Scherer 2012). Häufig sind hier Proteine betroffen, die an der Synapse, welche die Kontakt- und Übertragungsstelle zwischen Neuronen

bildet, lokalisiert sind. In diesem Fall wird von sogenannten „Synaptopathien“ gesprochen. Von den Mutationen können hierbei Proteine sowohl erregender, glutamaterger Synapsen als auch inhibitorischer, hemmender Synapsen betroffen sein. Derzeit wird davon ausgegangen, dass unter anderem Ungleichgewichte zwischen erregender und hemmender synaptischer Übertragung zu autistischen Verhaltensweisen führen können (Won et al. 2013; Chen et al. 2014).

## 1.2 Mausmodelle für Autismus-Spektrum-Störungen

Die bereits erwähnte Identifikation der für Autismus-Spektrum-Störungen ursächlichen genetischen Veränderungen ist die Voraussetzung für die Entwicklung von Mausmodellen für ASD. Durch die gezielte Manipulation von als ursächlich identifizierten Genen, sollen sich bei der Maus autistische Verhaltensweisen aufzeigen. Somit ist es möglich, *in vivo* die Folgen der Genmutation aus pathophysiologischer und verhaltensbiologischer Sicht zu analysieren (Ey et al. 2011).

Drei Kriterien sollten bei einem erfolgreich generierten Mausmodell für ASD erfüllt sein: Zunächst sollte Konstruktvalidität vorliegen, welche durch die gezielte Genmanipulation erreicht wird. Weiterhin wichtig ist die sogenannte augenscheinliche Validität, was bedeutet, dass die Mäuse die bereits oben erwähnten diagnostischen Kriterien der ASD, nämlich soziale Interaktionsdefizite und repetitive, stereotype Verhaltensweisen aufweisen sollten. Diese zeigen sich beispielsweise in Form von sozialen Störungen, wie Desinteresse an anderen, gesunden Mäusen sowie in übermäßigem Fellpflegeverhalten und weiteren motorischen Stereotypien (Silverman et al. 2010). Als drittes Kriterium ist die Vorhersagevalidität zu nennen. Hierbei sollten die Mäuse ähnliche Reaktionen wie Menschen auf bereits existierende effektive Behandlungsmöglichkeiten zeigen. Ein erfolgreich generiertes Mausmodell dient nun für wichtige pathophysiologische Analysen (Crawley 2004). Da die Pathologie der ASD überwiegend durch eine Störung auf synaptischer Ebene zu begründen ist, bieten sich in diesem Zusammenhang neben elektrophysiologischen auch morphologische Analysen synaptischer Kontakte im Mausmodell an.

## 1.3. Morphologische Analyse synaptischer Kontakte

Synapsen dienen als Kontakt- und Übertragungsstelle zwischen Neuronen und bestehen aus einer prä- und postsynaptischen Komponente. Im Zusammenhang mit ASD und weiteren neuropsychiatrischen Erkrankungen konnten bereits wiederholt morphologische Veränderungen von Synapsen beschrieben werden (Hutsler u. Zhang 2010; Penzes et al. 2011). Die bereits im Zusammenhang mit den Autismus-Spektrum-Störungen genannten exzitatorischen Synapsen befinden sich vorwiegend an sogenannten dendritschen Spines. Dendriten sind hierbei die Zellfortsätze der Nervenzellen. Sie dienen der Reizaufnahme sowie –weiterleitung. Spines sind kleine Vorwölbungen entlang der Dendriten, welche die postsynaptische Komponente bei der Informationsübertragung darstellen. Die Morphologie bzw. Gestalt der dendritischen Spines hängt unmittelbar mit der Funktion der exzitatorischen Synapse zusammen – so haben kleinere Spines auch eine kleinere synaptische Übertragungsfläche. Dies hat eine geringere synaptische Übertragung zur Folge (van Spronsen u. Hoogenraad 2010). Interessanterweise wurde bereits des Öfteren berichtet, dass die Spinedichte bei Vorliegen einer ASD verändert ist. So wurde beispielsweise eine erhöhte Spinedichte im Kortex mancher ASD-Patienten gefunden (Hutsler u. Zhang 2010).

Aufgrund ihrer morphologischen Erscheinung werden Spines in „stubby“ (stummelförmig; ihnen fehlt ein erkennbarer Spine-Hals), „thin“ (dünn), „mushroom“ (pilzförmig) sowie „filopodia-like“ (filopodienartig) klassifiziert (Peters u. Kaiserman-Abramof 1970), wobei im adulten Kortex des Nagetiers vorwiegend dünne und pilzförmige Spines aufzufinden sind (Miller u. Peters 1981). Eine Zuordnung zu einer der vier Spine-Klassifikationen stellt sich jedoch als schwierig dar, da Spines keine stabile Struktur einnehmen, sondern kontinuierlich ihre Form verändern. Es existieren verschiedene Theorien zu den möglichen Funktionen dieser dynamischen Spinemotilität. Zum einen wird vermutet, dass die sich rapide verändernden Spinezustände wichtig sind für die Synaptogenese, also die Bildung neuer Synapsen. Weiterhin wird ein Zusammenhang zwischen der raschen Strukturveränderung und der synaptischen Funktion gesehen. Eine weitere Funktion wird in der Kompartimentierung von Calcium in Spines gesehen, welche eine wichtige Rolle bei der neuronalen

Plastizität spielt und somit Einfluss auf die Lern- und Gedächtnisfunktion hat (Bonhoeffer u. Yuste 2002).

### 1.3.1 Autismus-Gene und deren postulierte Rolle für die Spinemorphologie

Für die Pathogenese der ASD werden mitunter Störungen synaptischer Regulationsmoleküle verantwortlich gemacht. Einige Mutationen dieser Regulationsmoleküle führen mitunter zu einer Veränderung der Spinemorphologie und der Spineanzahl. Beispielsweise sind hier die Neurexine und Neuroligine zu nennen. Hierbei handelt es sich um synaptische Zelladhäsionsmoleküle. Sie sorgen für eine funktionierende Verbindung zwischen der Prä- und Postsynapse, wobei z.B. Neurexin 1 präsynaptisch und Neuroligin 3/4 auf der postsynaptischen Seite zu finden sind (Sudhof 2008). Mutationen in den Genen, die für Neurexin 1 bzw. Neuroligin 3/4 kodieren können beispielsweise zu einer Veränderung der Spinedichte führen (Chih et al. 2004; Dudanova et al. 2007).

Ebenso assoziiert mit Autismus sind die postsynaptischen Signalproteine TSC1 und TSC2 sowie PTEN, wobei Mutationen in den TSC-Genen insbesondere die Spinegröße beeinflussen (Tavazoie et al. 2005), während Mutationen in PTEN zu einer größeren Spinedichte führen (Kwon et al. 2006). Ein weiteres Beispiel sind Genmutationen der Shank-Proteinfamilie, welche sich unterhalb der postsynaptischen Membran in der postsynaptische Dichte befindet (PSD für „postsynaptic density“) (Boeckers 2006). Dass sich bei ASD-Patienten, wie weiter oben bereits beschrieben, eine veränderte Spinemorphologie vorfinden lässt, stellt sich vor allem in Zusammenhang mit den SHANK-Proteinen als interessant dar, da diese entscheidend für das Wachstum und die Entwicklung dendritischer Spines zu sein scheinen (Sala et al. 2001). Im Folgenden soll auf diese besondere Proteinfamilie eingegangen werden.

## 1.4 PROSAP/SHANK-Proteinfamilie

Bei den SHANKS (SH3 domain and ankyrin repeat-containing proteins), welche alternativ auch PROSAPs (proline-rich synapse-associated proteins) genannt werden, handelt es sich um Gerüstproteine, welche sich in der neuronalen PSD befinden und durch mehrere Protein-Protein-Interaktionsdomänen charakterisiert sind. Diese weisen wiederum Verbindungen zu Elementen des Zytoskeletts sowie zu einigen postsynaptisch lokalisierten Rezeptoren auf. Dadurch entsteht das „Gerüst" der PSD (Boeckers et al. 2002; Sheng u. Kim 2000; Boeckers 2006). SHANK1, SHANK2 (auch PROSAP1) sowie SHANK3 (auch PROSAP2) sind die drei Unterformen der SHANK-Familie und alle hochexprimiert im Gehirn vorzufinden (Boeckers et al. 1999).

Interessanterweise wurden genetische Veränderungen von *SHANK3* bei fast allen Patienten mit Phelan-McDermid-Syndrom bzw. 22q13-Deletionssyndrom entdeckt. Es handelt sich dabei um eine komplexe syndromale Entwicklungsstörung (Bonaglia et al. 2001; Wilson et al. 2003). Da sich bei den Betroffenen häufig autistische Verhaltensweisen zeigen, wurde *SHANK3* in weiteren Studien auch mit nicht-syndromaler ASD in Verbindung gebracht (Durand et al. 2007). Darüber hinaus konnten in den letzten Jahren auch Mutationen in *SHANK2* bzw. *SHANK1* bei Patienten mit ASD identifiziert werden (Berkel et al. 2010; Sato et al. 2012; Leblond et al. 2014). Zusammenfassend deutet dies auf eine Assoziation zwischen der gesamten SHANK-Proteinfamilie und den Autismus-Spektrum-Störungen hin.

Obwohl im Nagetier unterschiedliche Shank-Isoformen existieren, kann man den grundsätzlichen Proteinaufbau wie folgt beschreiben: am N-terminalen Ende finden sich Ankyrin-Wiederholungen, welche mit dem PSD-Zytoskelett interagieren. Darauf folgen in C-terminale Richtung weisend eine SH3- (Scr homology 3), eine PDZ- (PSD-95/DLG-/ZO1) sowie im C-Terminus eine SAM-Domäne (sterile alpha motif). Zwischen der PDZ- und SAM-Domäne liegt ein für die Shank-Familie typischer Prolin-reicher Proteinabschnitt. Hierzu gehört auch die sogenannte ppI-Domäne sowie die HBs (Homer binding site). Insgesamt handelt es sich hierbei um viele Protein-Protein-Interaktionsdomänen, welche vor allem für postsynaptische Regulationsprozesse unerlässlich sind (Boeckers et al. 2002; Boeckers 2006). Besonders die

PDZ-Domäne spielt durch ihre Interaktion mit den ionotropen Glutamatrezeptoren NMDAR (N-methyl-D-aspartate receptor) und AMPAR (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor) eine wichtige Rolle für die synaptische Funktion (Garner et al. 2000). Der NMDA-Rezeptor ist hierbei mit der PDZ-Domäne der Shanks indirekt über PSD-95 und GKAP verbunden. Der AMPA-Rezeptor kann dahingegen direkt oder indirekt mit der PDZ-Domäne der Shanks verbunden sein. Die indirekte Verbindung erfolgt hier über GKAP-PSD-95-Stargazin (Bredt u. Nicoll 2003; Kim u. Sheng 2004; Naisbitt et al. 1999). Die eben genannte HBs bindet Homer-Proteine. Diese Homer-Proteine binden wiederum metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) sowie $IP_3$Rs (Ionositoltriphosphat-Rezeptor) (Tu et al. 1999; Tu et al. 1998). Homer scheint durch diese Interaktionen Einfluss auf den intrazellulären $Ca^{2+}$-Einstrom zu nehmen und trägt letztlich in Kombination mit Shank zur Spinemorphologie, genauer gesagt zum Spinewachstum, bei (Sala et al. 2001). Zusätzlich scheint die Struktur von Homer Einfluss auf die Spinedichte und –länge zu haben. Liegt Homer nicht in seiner üblichen Tetramer-Struktur vor, sondern als Dimer, hat dies eine Reduktion der Spinedichte sowie längere und unreifere Spines zur Folge. Homer und Shank arbeiten bei der Spinereifung synergistisch zusammen (Hayashi et al. 2009). Die N-terminale Ankyrin-Domäne weißt zwei Interaktionspartner auf. Zum einen alpha-Fodrin, welches eine Verbindung zwischen den Ankyrin-Wiederholungen der Shanks und dem Aktin-Zytosklett darstellt (Boeckers et al. 2001). Zum anderen stellt Sharpin einen weiteren Interaktionspartner des Aktin-Zytoskeletts dar (Lim et al. 2001). Eine zusätzliche Verbindung zwischen der Shank-Proteinfamilie mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle wird durch Cortactin erreicht. Dies verbindet F-Aktin mit der ppI-Domäne innerhalb des Prolin-reichen Abschnitts der Shanks (Du et al. 1998; Boeckers et al. 2002). Ebenso verbindet Abp1 (actin binding protein 1) mit seiner SH3-Domäne den C-terminalen Bereich der Shanks mit dem Zytoskelett (Qualmann et al. 2004). Abp1 scheint eine wichtige Rolle in Zusammenhang mit der Spinereifung zu spielen. Wird Abp1 herunterreguliert, führt dies zu einer Reduktion der Synapsendichte und der pilzförmigen Spines, wohingegen eine Überregulation zur Vermehrung dieser Spines und zu einer größeren Synapsendichte führt (Haeckel et al. 2008). Die C-terminale SAM-Domäne als helikale Struktur ist zusammen mit $Zn^{2+}$ verantwortlich für die postsynaptische Anordnung von

Shank2 und Shank3 (Gundelfinger et al. 2006; Grabrucker et al. 2011; Baron et al. 2006).

Insgesamt macht diese Veranschaulichung deutlich, dass die Shank-Familie die Verbindungsstelle zwischen dem Aktinzytoskelett der Spines und Proteinen auf der postsynaptischen Membran darstellt.

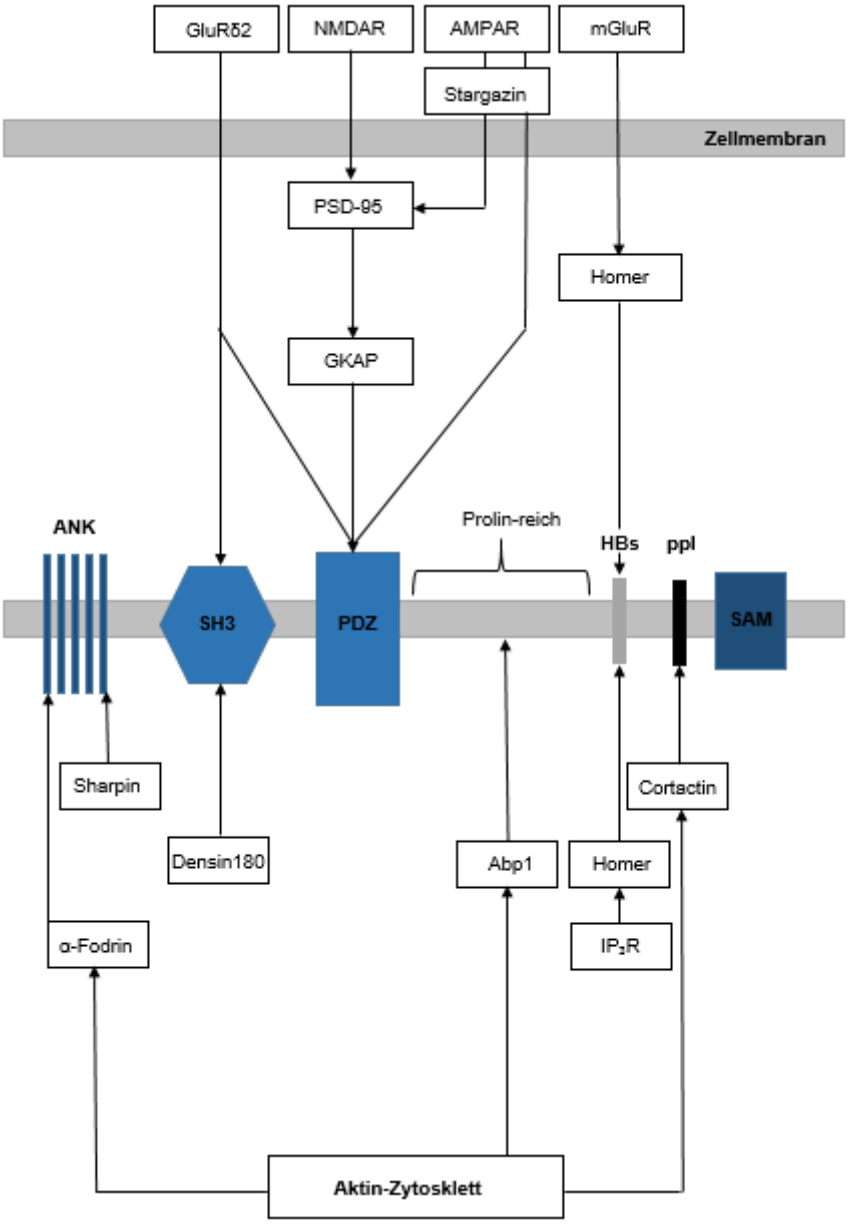



**Abbildung 1. Überblick über die Struktur der *Shanks* sowie wichtige Protein-Protein-Interaktionsdomänen.**

Abp1 = actin binding protein 1, AMPAR = primarily alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid-Rezeptor, ANK = Ankyrin, GKAP = Guanylate-Kinase-assoziiertes Protein, GluRδ2 = Glutamatrezeptor δ2, Hbs = Homer binding site, $IP_3R$ = Inositoltriphosphat-Rezeptor, mGluR = metabotropher Glutamatrezeptor, NMDAR = N-methyl-D-aspartat-Rezeptor, PDZ = PSD-95/DLG-/ZO1, PSD-95 = Postsynaptisches Dichteprotein-95, SAM = sterile alpha motif, SH3 = Scr homology 3 (eigene Darstellung, in Anlehnung an Gundelfinger et al. (2006)).

### 1.4.1 *Shank*-Mausmutanten

Wie bereits weiter oben im Text beschrieben, wurde bereits eine Vielzahl an Mausmodellen entwickelt, bei welchen sich durch Manipulation von Genen bei den Tieren autistische Verhaltensweisen gezeigt haben. Hier soll im Speziellen auf Mutationen von Shank-Proteinen eingegangen werden**.**

**Shank1**

Bislang gibt es eine *Shank1*-Mausmutante. Diese wurde im Jahr 2008 erstmals publiziert (Hung et al. 2008). Hierbei handelt es sich um eine *Shank1*-Knock-out-Maus (*Shank1*-KO-Maus), bei welcher die Exons 14 und 15 deletiert wurden. Diese beiden Exons sind u. a. wichtig für die Kodierung der weiter oben beschriebenen PDZ-Domäne von Shank1. Hierbei kommt es nach alter Klassifikation zum Verlust der in Nagern bekannten Shank1-Isoformen (Shank1α, Shank1β, Shank1γ und Shank1δ) (Lim et al. 1999). Auf morphologischer Ebene zeigten sich *in vivo* Veränderungen der synaptischen Struktur. Hierzu wurden die Spines apikaler Dendriten in CA1 (Cornu ammonis), genauer in der CA1-Region des Hippocampus auf Veränderungen der Spinedichte, Spinelänge und Spinebreite untersucht. Alle drei Parameter waren hierbei leicht reduziert. Die daraufhin elektrophysiologisch gemessene basale synaptische Übertragung zeigte sich ebenfalls reduziert (Hung et al. 2008).

Auf biochemischer Ebene zeigte sich in der Analyse von PSD-Fraktionen des Vorderhirns eine Reduktion von GKAP (etwa 30 %) sowie ein leichter Rückgang (20 %) von Homer1b/c. Andere Shank-Interaktionspartner wie z. B. mGluRs, NMDA- oder AMPA-Rezeptoruntereinheiten blieben unverändert. In Verhaltenstests zeigte sich neben einem Angstverhalten ein verbessertes räumliches Gedächtnis, jedoch eine Verschlechterung des Langzeitgedächtnisses (Hung et al. 2008). Im Jahr 2011 wurden die Verhaltensanalysen durch zwei weitere Studien im *Shank1*-KO fortgeführt (Wohr et al. 2011; Silverman et al. 2011). Dabei stellten Wöhr et al. (2011) Defizite in der sozialen Interaktion der Tiere fest. Silverman et al. (2011) konnten neben einem leichten Angstverhalten dagegen vor allem motorische Funktionsdefizite der Mäuse aufzeigen (Kleijer et al. 2014).

**Shank 2**

Aktuell existieren zwei *Shank2*-Mausmutanten:

Im Jahr 2012 publizierten Schmeisser et al. (2012) ein *Shank2*-Mausmodell, welches eine Deletion des Exon 7 (*Shank2* ∆ex7) aufweist. Die Gehirnmorphologie der Tiere erwies sich hier als unauffällig. Die Untersuchung der CA1-Spinemorphologie ergab eine leichte Reduktion der Spineanzahl im Stratum radiatum, die PSD-Struktur blieb jedoch unverändert.

Die stark verängstigten Mäuse waren deutlich hyperaktiv, die soziale Interaktion war gestört und auch repetitive Verhaltensweisen, wie übermäßige Fellpflege konnten nachgewiesen werden. Die elektrophysiologisch gemessene basale synaptische Übertragung an CA1 Spines erwies sich als reduziert, das Verhältnis von NMDA/AMPA war dagegen erhöht. Es zeigte sich kein Einfluss auf die LTD (long term depression), wohingegen die LTP (long term potentiation) erhöht war, so dass eine abnorme synaptische Plastizität anzunehmen ist (Schmeisser et al. 2012).

Noch im selben Jahr wurde ein zweites Mausmodell veröffentlicht, welches eine Deletion von Exon 6 und Exon 7 aufweist (*Shank2* ∆ex6-7) (Won et al. 2012). Die Gehirnstruktur erschien auch hier normal. Die Spinestruktur in CA1 erwies sich als unauffällig. Bei der Untersuchung des Sozialverhaltens der *Shank2* ∆ex6-7$^{-/-}$-Mäuse zeigte sich eine reduzierte Interaktion mit anderen gesunden Mäusen. Autistische Verhaltensweisen wie Hyperaktivität und Angstverhalten konnten bei den *Shank2* ∆ex6-7$^{-/-}$-Mutanten ebenso nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten sich Gedächtnis- und Lernschwierigkeiten. Die synaptische Übertragung an CA1 Spines war unverändert, während ein reduziertes NMDA/AMPA-Verhältnis festgestellt wurde. Die LTP war ebenfalls reduziert, was das Vorliegen einer abnormen synaptischen Plastizität impliziert (Won et al. 2012).

**Shank3**

Aktuell existieren sechs *Shank3*-Mausmodelle. Auf diese soll im Folgenden eingegangen werden:

Bozdagi et al. (2010) entwickelten ein *Shank3*-Modell, das eine Deletion von Exon 4 – 9 aufweist (kodierend für die Ankyrin-Domäne). Dies bedeutet, dass auf Proteinebene die langen Isoformen Shank3a und Shank3b eliminiert sind. Die entstandenen heterozygoten männlichen Mausmutanten zeigten soziale Interaktionsdefizite auf. Weiterhin kam es zu einer Reduktion der basalen synaptischen Übertragung mit reduzierter LTP bei unbeeinflusster LTD. Durch Stimulation (θ-burst pairing) von Spines in der CA1-Region des Hippocampus wurde lediglich eine flüchtige morphologische Spineexpansionen gezeigt, was auf eine gestörte synaptische Plastizität schließen lässt (Bozdagi et al. 2010).

Wang et al. (2011) entwickelten ebenfalls ein *Shank3*-Mausmodell mit einer Deletion von Exon 4 – 9, welche auch hier für die Ankyrin-Domäne kodieren. Auch hier wurden die Proteinisoformen Shank3a sowie Shank3b eliminiert (Jiang et al. 2013). Das Verhalten der Mäuse zeigte eindeutige autistische Züge. Es kam zu repetitiven Verhaltensweisen, sozialen Verhaltensauffälligkeiten, abweichende Bewegungsmuster sowie gestörtem Lernverhalten. Die morphologischen Analysen ergaben diskrete Spineveränderungen im Hippocampus insbesondere zu bestimmten Zeitpunkten der postnatalen Hirnentwicklung (Wang et al. 2011).

Durch Peca et al. (2011) wurden zwei *Shank3*-Mausmodelle entwickelt. Zum einen die *Shank3A*-Mutante und zum anderen die *Shank3B*-Mutante. Bei der *Shank3A*-Mutante wurde eine Deletion von Exon 4 – 7 vorgenommen, welche wiederum für die Ankyrin-Domäne kodieren. Hierbei wurden nach aktueller Klassifikation durch Jiang et al. (2013) die Protein-Isoformen Shank3a sowie Shank3b eliminiert. Bei der *Shank3B*-Mutante wurde der Abschnitt deletiert, der für die PDZ-Domäne kodiert – die Exons 13 – 16. In dieser Mutante wurden zusätzlich die Isoformen Shank3c und Shank3d eliminiert (Jiang et al. 2013). Bei der Betrachtung der Verhaltensweisen beider Mutantenmodelle, stellte sich heraus, dass die *Shank3B*-Mutanten deutlich stärkere autistische Verhaltensweisen zeigen (Probleme bei der sozialen Interaktion, übermäßige Fellpflege) als die *Shank3A*-Mutanten. Auch hier wurden Einflüsse

auf die Spinemorphologie, allerdings einzig im Striatum, festgestellt (Peca et al. 2011).

Schmeisser et al. (2012) konzentrierte sich, wie oben beschrieben, nicht nur auf das *Shank2*-Mausmodell, sondern führte einen Vergleich zwischen *Shank2*-Mutanten und *Shank3*-Mutanten durch. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es bei den *Shank2* ∆ex7 Mutanten, wie bereits oben erwähnt, zu einer kompensatorischen Erhöhung von Shank3 vor allem im Striatum kam, während umgekehrt bei den *Shank3*-Mutanten eine Hochregulation von Shank2 festzustellen war (Schmeisser et al. 2012). Aufgrund der aktuellen Datenlage ist festzustellen, dass in den *Shank3*-Mutanten sehr wahrscheinlich nicht nur die nach alter Nomenklatur erwähnten Protein-Isoformen Shank3α und Shank3β eliminiert wurden, sondern mindestens die nach neuer Nomenklatur geltenden Isoformen Shank3a, Shank3b sowie Shank3c (Jiang et al. 2013).

Kouser et al. (2013) entwickelte durch Deletion von Exon 21 eine homozygote *Shank3*-Mutation in der Maus. Von der Deletion betroffen ist hierbei die Homer-bindende Domäne, sodass ein N-terminales Abbruchprotein exprimiert wird. Diese *Shank3*-Mutanten zeigten leichte Defizite der sozialen Interaktion, die motorische Koordination war herabgesetzt. Ältere *Shank3*-Mutanten (10-13 Monate alt) wiesen ein verstärktes Putzverhalten auf. Die morphologische Untersuchung der Spinedichte in der CA1-Region des Hippocampus ergab keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (Kouser et al. 2013).

Zuletzt soll auf das *Shank3*-Überexpressionsmodell von Han et al. (2013) näher eingegangen werden, da es im Rahmen der späteren Diskussion von Bedeutung sein wird. In diesem Modell kommt es zu einer Erhöhung von Shank3 um insgesamt 50 %. Es wurde untersucht, wie sich die Dichte der Spines bei Überexpression von Shank3 verändert. Dabei konnte festgestellt werden, dass es zu einer signifikanten Erhöhung der Spinedichte kommt (Han et al. 2013).

Insgesamt zeigen die bislang durchgeführten Analysen von *Shank*-Mausmutanten, dass sich durchaus morphologische Veränderungen an dendritischen Spines einstellten. Wie schon weiter oben beschrieben, wird seit dem Jahr 2001 vermutet, dass Shank einen Einfluss auf die Reifung dieser so wichtigen postsynaptischen

Strukturen hat (Sala et al. 2001). Auf die aktuell verfügbaren Erkenntnisse soll daher im Folgenden näher eingegangen werden.

## 1.5 Spineanalyse in *Shank*-Mutanten

Hung et al. (2008) untersuchten Spines in adulten *Shank1*-KO-Mäusen entlang von apikalen Dendriten der Pyramidenzellen in der CA1-Region des Hippocampus (Stratum radiatum). Die Mutanten wiesen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine nur geringe Reduktion der Spinedichte auf. Daneben wurden die Spinelänge und die Breite des Spinekopfes analysiert. Der „cumulative frequency plot“ (für „Häufigkeitssummendiagramm“) zeigte, dass die Spinelänge und Spinebreite ebenso leicht reduziert sind. Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass der Verlust von Shank1 insgesamt einen nur geringen Einfluss auf Anzahl und Morphologie dendritischer Spines in CA1 hat (Hung et al. 2008).

Schmeisser et al. (2012) und Won et al. (2012) untersuchten Spines in der CA1-Region des Hippocampus (Stratum radiatum) von *Shank2*-KO-Mäusen. Schmeisser et al. (2012) konnten in der *Shank2*-Mutante innerhalb dieser Hirnregion eine leichte Reduktion der Spinedichte aufzeigen, während Won et al. (2012) in der *Shank2*-Mutante eine unveränderte Spinedichte im Vergleich zum Wildtyp aufzeigten. Es wurden hierbei jedoch unterschiedliche Analysemethoden angewandt: Schmeisser et al. (2012) untersuchten die Spinedichte durch Golgifärbung, Won et al. (2012) untersuchten diese mit Hilfe der Elektronenmikroskopie. Aus beiden Studien kann man schließen, dass auch der Verlust von Shank2 auf die Spinedichte in CA1 einen eher geringen Einfluss hat. Spinelänge und Spinebreite wurden in *Shank2*-Mutanten bisher nicht untersucht.

Es stellt sich nun die Frage, was die Folgen eines Verlusts von Shank3 für die Spinedichte und Spinemorphologie sein könnten. Hierzu wurden mehrere Studien, vorwiegend in der CA1-Region des adulten Hippocampus, durchgeführt. Schmeisser et al. (2012) konnten z.B. in der *Shank3*-Mutante keine signifikante Veränderung

der Spinedichte nachweisen. Wang et al. (2011) betrachteten in deren *Shank3*-Mutante im Hippocampus (CA1) die Spinedichte und Spinelänge. Hierfür wurden dendritische Spines zu zwei verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Während sich zum ersten Zeitpunkt, nach 4 Wochen, eine reduzierte Spinedichte sowie signifikant längere Spines zeigten, war die Spinedichte nach 10 Wochen nicht mehr reduziert, die Spines waren aber nach wie vor länger. Der Unterschied in der Entwicklung der Spinedichte wurde entweder auf mögliche Unterschiede der Methodensensitivität oder bislang ungeklärte entwicklungsbedingte Ursachen zurückgeführt (Wang et al. 2011).

Wenig später konnten Kouser et al. (2013) bei der Analyse der Spinedichte in der CA1-Region des adulten Hippocampus keine Veränderung in ihren *Shank3*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp aufzeigen, während im selben Jahr Han et al. (2013) durch Überexpression von Shank3 eine erhöhte Spinedichte an den apikalen Sekundärdendriten der Pyramidenzellen der CA1-Region des adulten Hippocampus nachweisen konnten.

In der *Shank3*-Mutante von Peca et al. (2011) wurden MSNs (medium spiny neurons) im dorsalen Striatum der noch juvenilen Maus hinsichtlich Dichte, Länge, Breite des Spineshalses sowie Durchmesser des Spineskopfes analysiert. Es zeigte sich eine signifikant reduzierte Spinedichte. Der Spinehals war verbreitet, Spinelänge und der Durchmesser des Spinekopfes blieben unverändert (Peca et al. 2011).

Die Daten der aufgeführten *Shank3*-Mutanten zeigen im Vergleich zu den weiter oben aufgeführten Analysen der *Shank2*- und *Shank1*-Mutanten insgesamt sehr heterogene Effekte hinsichtlich der Parameter Spinedichte, Spinelänge sowie Spinebreite. Dies kann zum einen darauf zurückgeführt werden, dass die Regulation der zahlreichen, in ihrer Funktion unterschiedlichen *Shank3*-Isoformen in jeder Mutante unterschiedlich stark gestört ist. Zum anderen scheinen entwicklungs- und hirnregionenspezifische Effekte eine Rolle zu spielen (Wang et al. 2014).

**Tabelle 1. Überblick über bisherige Erkenntnisse zur Spineanalyse in Shankmutanten in vivo.**

| | **Region Subregion Neurone** | **Methode Schnittdicke** | **Zeitpunkt der Untersuchung** | **Untersuchte Parameter** | **Ergebnis** |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Shank1*** **(Hung et al. 2008)** | Hippocampus CA1 Pyramidenzellen (apikale Dendriten) | DiI-Färbung 200 µm | Adult | Spinedichte Spinelänge Spinebreite | *Shank1*-KO: Spinedichte:↓ (leicht) Spinelänge: ↓ (leicht) Spinebreite: ↓ (leicht) |
| ***Shank2*** **(Won et al. 2012)** | Hippocampus CA1 Pyramidenzellen | Durcupan ACM-Kit mit Elektronen-Mikroskopie Ultradünne Schnittdicke | P56 – P63 | Spinedichte | *Shank2*-KO: Spinedichte: ↔ |
| ***Shank2*** ***bzw. Shank3*** **(Schmeisser et al. 2012)** | Hippocampus CA1 Pyramidenzellen (Sekundärdendriten) | Golgi-Cox-Färbung (klassisch) 200 µm | P70 | Spinedichte | *Shank2*-KO: Spinedichte: ↓ (leicht) *Shank3*-KO: Spinedichte: ↔ |
| ***Shank3*** **(Wang et al. 2011)** | Hippocampus CA1 | FD Rapid Golgi-Kit 100 µm | P28 P70 | Spinedichte Spinelänge, Spinekopfgröße | *Shank3*-Mutante: **P28:** Spinedichte: ↓ Spinelänge: ↑ **P70:** Spinedichte: ↔ Spinelänge: ↑ Spinekopfgröße: ↔ |
| ***Shank3*** **(Kouser et al. 2013)** | Hippocampus CA1 (apikale Dendriten) | FD Rapid Golgi-Kit 100 µm | P42 - 56 | Spinedichte | *Shank3*-Mutante: Spinedichte: ↔ |
| ***Shank3*** ***(Han et al. 2013)*** | Hippocampus CA1 (apikale Sekundärdendriten) | FD Rapid Golgi-Kit 50 µm | P70 | Spinedichte | *Shank3*-Überexpression: Spinedichte: ↑ |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Shank3* (Peca et al. 2011)** | Striatum Dorsales Striatum „Medium Spiny Neurons“ | FD Rapid Golgi-Kit, Lucifer-yellow-cell filling 100 µm | P35 | Spinedichte, Spinelänge, Durchmesser Spinekopf, Breite Spinehals | <u>*Shank3*-Mutante:</u><br>Spinedichte: ↓<br>Spinelänge: ↔<br>Durchmesser Spinekopf: ↔<br>Spinehals: ↑ |

Abschließend ist nach Beurteilung der aufgeführten *in vivo*-Studien zu sagen, dass der Verlust von Shank1 bzw. Shank2 zumindest im adulten Tier keine starken Einflüsse auf die Parameter Spinedichte, -länge und breite zu haben scheint. Dagegen zeigen sich hinsichtlich des Verlustes von Shank3 bzw. von Shank3-Isoformen durchaus vielfältige sowie unterschiedliche Effekte auf die Parameter. Insgesamt handelt es sich bei den vorgestellten Studien jedoch um genetisch unterschiedliche Modelle, die darüber hinaus unter anderem zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien und zum Teil auch mit leicht unterschiedlicher Methodik untersucht wurden, weshalb eine unmittelbare Vergleichbarkeit nur erschwert möglich ist.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die unter Punkt 1.5 aufgeführten Studien stellten den Einfluss einzelner Shanks (Shank1, Shank2 oder Shank3) auf die Dichte, Länge und Breite der Spines dar. Hierfür wurde pro Studie häufig eine einzelne Hirnregion, meistens die CA1-Region des Hippocampus, untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit soll aufgezeigt werden, welche Effekte der gleichzeitige Verlust von Shank2- und Shank3-Isoformen auf die genannten Parameter hat. Durch die Analyse von mehreren verschiedenen Hirnregionen sollen zusätzlich mögliche hirnregionenspezifische Effekte aufgezeigt werden.

Hierzu wurden dendritische Spines im *Shank2/Shank3*-DKO-Mausmodell untersucht (DKO bedeutet Doppel-Knockout). Analysiert wurden hierzu zum einen Spines der apikalen Sekundärdendriten im Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus. CA bedeutet in diesem Zusammenhang Cornu ammonis. Diese Spines

stellen glutamaterge Modellsynapsen dar, die im Mittelpunkt zahlreicher weiterer Studien stehen. Zum anderen wurden MSNs im Striatum untersucht, da das Striatum durch die corticostriatale Vernetzung eine wichtige Rolle bei komplexen Bewegungsabläufen spielt (DeLong 1990; Albin et al. 1989). Möglicherweise haben Störungen dieser Vernetzung Einflüsse auf repetitive Verhaltensweisen und Bewegungsabläufe bei ASD-Erkrankten (Langen et al. 2013). Im Rahmen dieser Analyse konzentrierten wir uns hierbei auf das DMS (dorsomediales Striatum) und das DLS (dorsolaterales Striatum).

Wie die obige Übersicht gezeigt hat, wurden bisher vor allem die Entwicklung der Spinedichte, Spinelänge und der Spinebreite untersucht. Diese Parameter sind zur Beurteilung der Spinemorphologie unerlässlich. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Effekte auf die Entwicklung aller drei Parameter im *Shank2/Shank3*-DKO sowohl an dendritischen Spines in der CA1-Region des adulten Hippocampus als auch an Spines im adulten DMS sowie im DLS aufgezeigt werden.

# 2. Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Tiere

*Shank2/Shank3*-DKO

Die Erstellung des *Shank2/*Shank3-DKOs erfolgte durch Kreuzung der *Shank2*$^{-/-}$-Mutanten mit *Shank3αβ*$^{-/-}$-Mutanten. Auf die Generierung beider Linien wurde bereits in der Veröffentlichung von Schmeisser et al. (2012) näher eingegangen. Während in Schmeisser et al. (2012) noch davon die Rede ist, dass bei der *Shank3αβ* $^{-/-}$-Maus nur die Isoformen Shank3α sowie Shank3β eliminiert wurden, existieren aktuell neue Erkenntnisse über die Einteilung der Shank3-Isoformen. Nach aktuell gültiger Einteilung wurden in der als ursprünglich von Schmeisser et al. (2012) als *Shank3αβ*$^{-/-}$-Maus deklarierten Mutante die Shank-Isoformen Shank3a, Shank3b sowie Shank3c eliminiert, während die Isoformen Shank3d, Shank3e, Shank3e-1 sowie Shank3f bestehen bleiben (Jiang u. Ehlers 2013; Wang et al. 2014).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Präparation des Mausgehirns und Färbung der Hirnschnitte mit dem FD Rapid GolgiStain Kit

Weibliche *Shank2/Shank3*-DKO-Mäuse sowie zugehörige Wildtyp-Kontrollen (P70 – P100) wurden in einem geschlossenen Kasten durch Zufuhr von Kohlenstoffdioxid getötet. Sofort im Anschluss wurden die Mausgehirne sorgfältig entnommen. Durch Eintauchen der Gehirne in bidestilliertes Wasser wurden sämtliche Blutreste entfernt. Die Gehirne wurden mithilfe des FD Rapid GolgiStain Kit gefärbt. Dieses setzt sich aus den Lösungen A, B, C, D und E zusammen. Daraufhin wurden die Gehirne in die Imprägnier-Lösung des FD Rapid GolgiStain Kit eingelegt. Diese

setzt sich aus der Lösung A und B zusammen, welche Quecksilberchlorid, Kaliumdichromat sowie Kaliumchromat enthalten und im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Insgesamt wurden pro Gehirn etwa 5 – 10 ml der Imprägnier-Lösung verwendet. Aufgrund der Toxizität dieser Zusammensetzung wurde ständig unter Schutzvorrichtungen gearbeitet. Die in die Lösung eingelegten Gehirne wurden 14 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert (FD Neurotechnologies Inc. 2012).

Nach zwei Wochen wurden die Gehirne aus der Lösung A und B entnommen und in Lösung C eingelegt. Für weitere 48 Stunden verweilten die Gehirne so bei 4 °C gekühlt in der Dunkelheit. Nach Ablauf dieser zwei Tage wurden die Gehirne mit Hilfe eines Vibratomes (Thermo Scientific Microm, HM 650 V von Thermo Scientific in Waltham, Massachusetts, USA) geschnitten. Dabei wurden Frontalschnitte im Abstand von 150 µm angefertigt. Anschließend erfolgte die Anordnung der Hirnschnitte auf einem Objektträger, auf welchem diese mit einem Tropfen der Lösung C versehen wurden. Die Schnitte trockneten nun bei Raumtemperatur (FD Neurotechnologies Inc. 2012).

Für die anschließend folgende Färbung der Schnitte wurden die Lösungen D, E des FD Rapid GolgiStain Kit sowie bidestilliertes Wasser verwendet. Hierzu wurden die Schnitte zunächst zweifach mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Jeder Wasch-Schritt dauerte zwei Minuten. Danach wurden die Gehirnschnitte in die Entwicklerlösung eingelegt. Diese setzt sich aus 10 ml der Lösung D, 10 ml der Lösung E sowie 20 ml bidestilliertem Wasser zusammen, also aus einem Verhältnis von 1:1:2. Die Schnitte mussten hierzu zehn Minuten in der Entwicklerlösung liegen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Hirnschnitte schließlich noch zwei Mal mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Jeder Wasch-Schritt dauerte hier jeweils vier Minuten. Zum Eindeckeln der Präparate wurde Kaisers Glycerin Gelatine verwendet. Da die Gelatine bei Raumtemperatur in einem festen Zustand vorliegt, wurde diese hierzu im Wasserbad erhitzt (maximal 55 °C), bis sie einen flüssigen Zustand erreicht hatte. Nach Zugabe der Gelatine auf das Präparat mit einer Pipette wurde dieses letztlich eingedeckelt und dunkel gelagert (FD Neurotechnologies Inc. 2012).

Leider wurde von Seiten des FD Rapid GolgiStain Kit Herstellers auf weitere Angaben zu den Bestandteilen der Lösungen C, D und E verzichtet, weshalb hierzu keine weiteren Aussagen getroffen werden können (FD Neurotechnologies Inc. 2013).

## 2.2.2 Analyse der Spines

### 2.2.2.1 Bestimmung der exakten Analyselokalisation

Die Analyse der Spines erfolgte in der CA1-Region des Hippocampus sowie im dorsalen Striatum. Innerhalb des dorsalen Striatums wurde zwischen dorsomedialem Striatum (DMS) und dorsolateralem Striatum (DLS) unterschieden. Um bei jedem Tier an der möglichst gleichen Stelle und in der jeweiligen gleichen Region die Spineanalyse durchzuführen, orientierten wir uns am sogenannten Bregma. Das Bregma 0 mm ist diejenige Stelle, an der die Sutura sagittalis (Pfeilnaht) auf die Sutura coronalis (Kranznaht) trifft und dient als Ausgangspunkt der Bregmaangaben. Während das positive Bregma den Bereich zwischen dem frontalen Gehirn und Bregma 0 mm darstellt, reichen die negativen Bregmas von Bregma 0 mm in Richtung des hinteren Hirnanteils.

Im Rahmen dieser Arbeit fand die Analyse im Hippocampus zwischen Bregma - 1 mm und -2 mm statt, während die Analyse des Striatums zwischen Bregma 0 mm und Bregma -1 mm erfolgte.

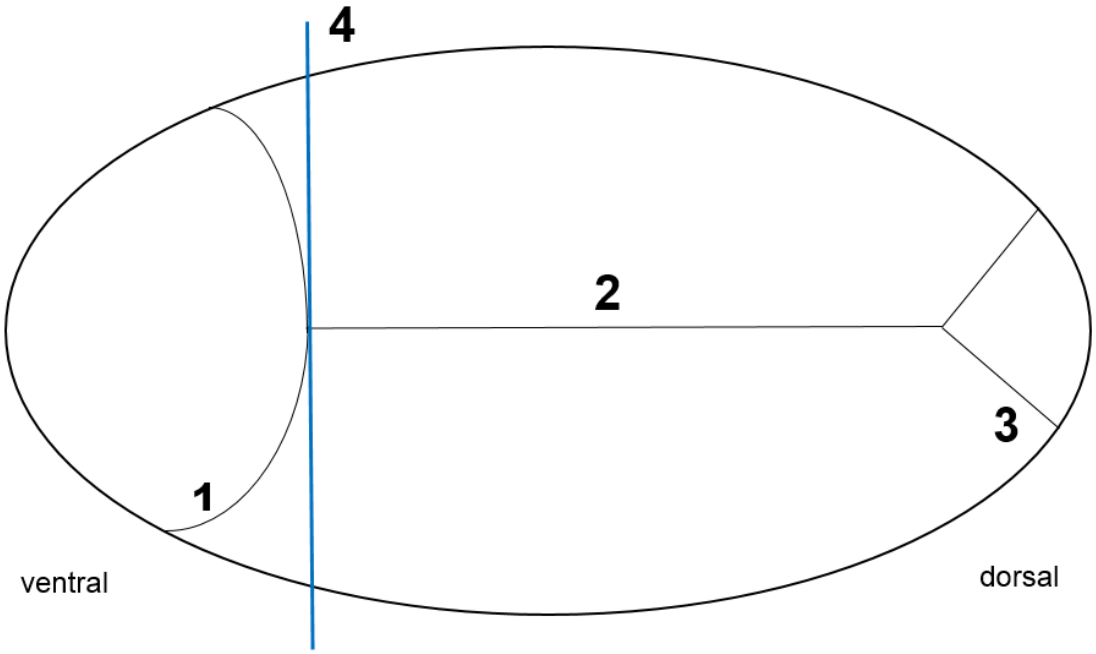



**Abbildung 2. Lokalisation des Bregma 0 mm.**

Als Orientierung dienen die Sutura coronalis (Kranznaht) an der ventralen Schädelseite (1) sowie die Sutura sagittalis (Pfeilnaht) (2). An deren Schnittpunkt liegt das Bregma 0 mm (4). Auf der dorsalen Schädelseite ist die Sutura lambdoidea (Lambdanaht) (3) aufzufinden. Ventral des Bregma 0 mm liegen die positiven Bregma-bereiche, dorsal davon die negativen Bregmabereiche.

Die zu analysierenden Abschnitte des Hippocampus (zwischen Bregma -1 mm und Bregma -2 mm) und des Striatums (zwischen Bregma 0 mm und -1 mm) liegen in dem Gehirnbereich, welcher hinter dem Zusammentreffen der Suturen liegt, also dorsal des Bregma 0 mm. Die folgenden Beschreibungen beziehen sich auf frontale Hirnschnitte.

Kriterien, welche als Orientierungspunkte für die richtige Lokalisation im dorsalen Striatum dienten, sind: 1) Bis auf mögliche kleinste Fasern ist der Hippocampus noch nicht zu sehen. 2) Die beiden Seitenventrikel liegen aus frontaler Sicht in ihrer nahezu breitesten Ausdehnung vor. 3) Die Capsula externa begrenzt nach lateral das sich stark ausdehnende Striatum.

Nach der Identifikation des Striatums war es wichtig zwischen dorsalem Striatum und ventralem Striatum (= Nucleus accumbens) zu unterscheiden. Das ventrale Striatum liegt allerdings zwischen dem Bregma 0,74 mm und 1,70 mm, was also deutlich weiter frontal im Verlauf liegt. Man erkennt in diesem Bereich auch deutlich

die noch geringe Ausdehnung des dorsalen Striatums. Weiter oben wurde bereits erwähnt, dass im Rahmen der Spineanalysen eine Unterscheidung zwischen DMS und DLS vorgenommen wurde. Diese beiden Bereiche wurden getrennt analysiert, da sie Afferenzen von unterschiedlichen Hirnregionen erhalten. Möglicherweise stellen sich daher unterschiedliche Effekte auf die Spinemorphologie im *Shank2/Shank3*-DKO dar. Da es somit im Nagetier keine eindeutige Struktur gibt, welche eine Unterscheidung zwischen DMS und DLS ermöglicht, haben wir uns auch hier Orientierungspunkte zur Lokalisation des richtigen Abschnitts verschafft. Zur Analyse diente die direkt medial der Capsula externa gelegene Hirnregion des dorsalen Striatums, medial begrenzt vom Seitenventrikel, lateral begrenzt durch den am weitesten lateral liegenden Abschnitt der Capsula externa. Für die Analyse der Neurone des dorsolateralen Striatums dienten die Neurone, welche innerhalb des Striatums am weitesten lateral, direkt am äußersten Anteil der Capsula externa liegen. Zur Auswahl der Neurone des dorsomedialen Striatums diente die direkt lateral dem Seitenventrikel angrenzende Region als Orientierung.

Für die Spineanalyse wurden Spines von Sekundärdendriten verwendet. Die differenzierte Analyse von DMS und DLS erklärt, weshalb hierfür frontal angefertigte Schnitte unerlässlich sind, denn mit sagittalen Schnitten wäre eine Unterscheidung nicht möglich.

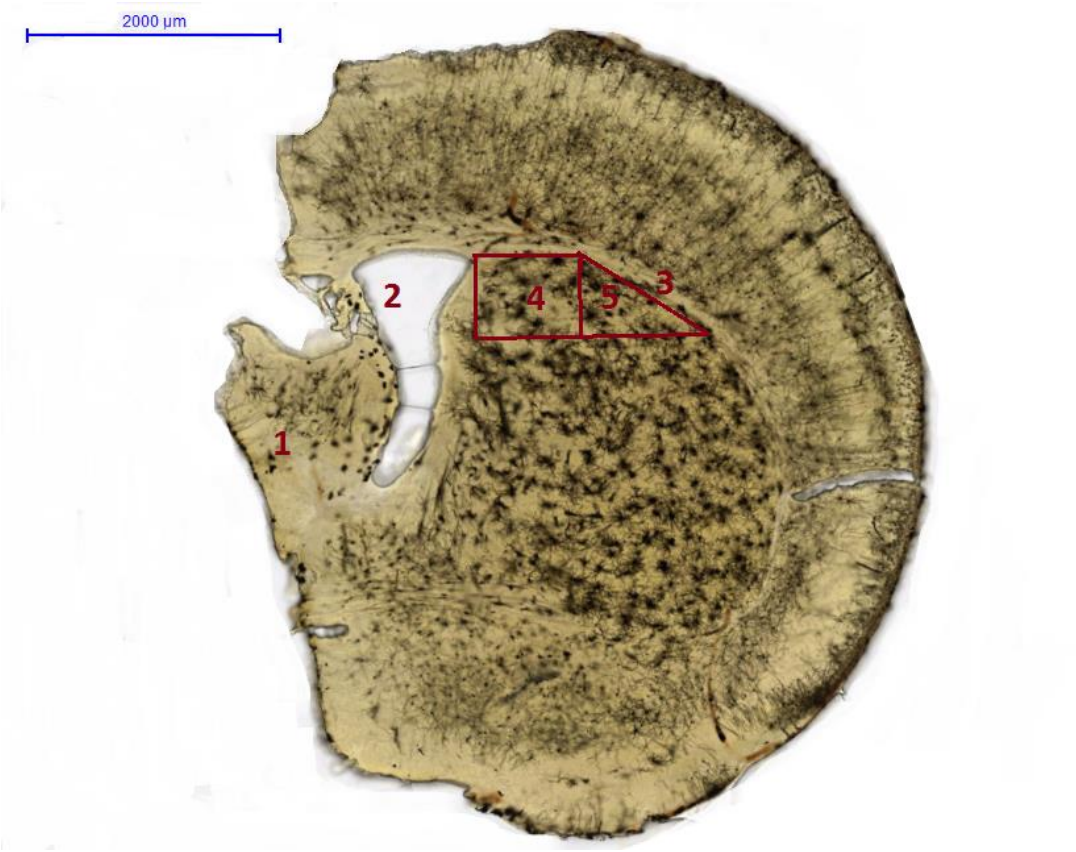



**Abbildung 3. Frontalschnitt eines Mausgehirnes auf Höhe Bregma 0 und Bregma -1 mm zur Identifikation des dorsomedialen und dorsolateralen Striatums.**

Als Orientierungspunkte dienen die Hippocampusfasern (1), welche auf den Beginn des Hippocampus andeuten sowie die breiteste Ausdehnung des Seitenventrikels (2). Lateral wird das Striatum durch die Capsula externa begrenzt (3). Zwischen Ventrikel und Capsula externa befindet sich das dorsomediale Striatum (4) sowie das dorsolaterale Striatum (5).

Die genaue Lokalisation von CA1 im Hippocampus zwischen Bregma -1 mm und - 2 mm erfolgte auch anhand neuroanatomischer Landmarken. 1) Die Seitenventrikel sind nur noch sehr schmal lateral des Hippocampus zu erkennen. 2) Der Hippocampus ist bereits deutlich und ausgeprägt mit den Regionen CA1, CA2, CA3 und dem Gyrus dentatus zu erkennen. 3) Der Hippocampus ist in seiner Ausdehnung noch auf die obere Hirnhälfte begrenzt. 4) Gegenüber und unterhalb der Pyramidenzellen der CA1-Region ist der Gyrus dentatus mit seinen Körnerzellen zu erkennen.




**Abbildung 4. Frontalschnitt eines Mausgehirnes auf Höhe Bregma -1 mm und Bregma - 2mm zur Identifikation der Region CA1 des Hippocampus.**

Als Orientierungspunkte zur Identifikation der CA1-Region des Hippocampus dienen das noch minimale Vorhandensein des Seitenventrikels (1), des Hippocampus mit seinen Regionen CA1, CA2, CA3 und dem Gyrus dentatus (2), sowie die Begrenzung des Hippocampus auf die obere Hirnhälfte (3). Gegenüber von CA1 ist der Gyrus dentatus (medialseitig von Ziffer 4) zu erkennen (4).

Für die Analyse dienten hier die Spines der apikalen Sekundärdendriten der Pyramidenzellen der CA1-Region. Wie durch die Tabelle der bisher durchgeführten Spineanalysen in *Shank*-Mutanten klar wurde, sind die Spines der CA1-Region als glutamaterge Modellsynpasen von besonderem Interesse in der Autismus-Forschung.

#### 2.2.2.2 Bildgebung und Messung der Spine-Parameter

Die Spineanalyse erfolgte am Axioskop Durchlichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) unter 63-facher Vergrößerung**.** Analysegegenstand waren die Spinedichte, Spinelänge sowie die Breite des Spinekopfes innerhalb der CA1-Region des Hippocampus sowie im DMS und DLS. Für die Spinedichte wurden Dendritensegmente mit einer durchschnittlichen Länge von 30 µm gewählt und die auf diesem Segment vorhandenen Spines abgezählt. Die Dichte ergab sich durch die Berechnung der Summe der Spines pro Dendritensegmentlänge. Für die Spinelänge wurde der Abschnitt zwischen dem Abgang des Spines vom Dendriten bis hin zur obersten Kopfstelle des Spines gemessen. Als Spine galt jede Dendriten-Vorwölbung, welche länger als 0,2 µm – 0,3 µm war. Die Spinebreite ergab sich durch Messung an der breitesten Stelle des Spinekopfes. Pro Maus wurden jeweils zehn Pyramidenzellen in der CA1-Region, sowie jeweils zehn MSNs im DMS und zehn MSNs im DLS untersucht. Pro Neuron wurden hierbei zwei Sekundärdendriten ausgewertet, was letztlich zu einer Anzahl von 20 Sekundärdendriten pro untersuchter Hirnregion führte. Für die Auswertung wurden mit dem Zeiss-Axioskop Z-Stacks angefertigt in Intervallen von 0,35 µm. Die Stacks wurden jeweils zu einem Bild zusammengefügt mit Hilfe der Axiovision-Software „Extended Focus Module“. Die Auszählung und Messung der Spines erfolgte mit ImageJ. Die gewonnenen Daten wurden mit Prism (GraphPad) analysiert. Je nach Verteilungsform wurden entsprechende statistische Tests angewandt. Zur Analyse der kumulativen Frequenzen diente der Kolomogrov-Smirnov-Test. Die durch Säulendiagramme dargestellten Ergebnisse wurden zunächst hinsichtlich Normalverteilung getestet. Bei normalverteilten Werten erfolgte die statistische Analyse mit Hilfe des T-Tests, bei nicht normalverteilten Werten wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (auch U-Test genannt) angewandt.

# 3. Ergebnisse

## 3.1 Morphologische Analyse definierter Hirnregionen des *Shank2/Shank3*-DKOs im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen

### 3.1.1 CA1-Region des Hippocampus

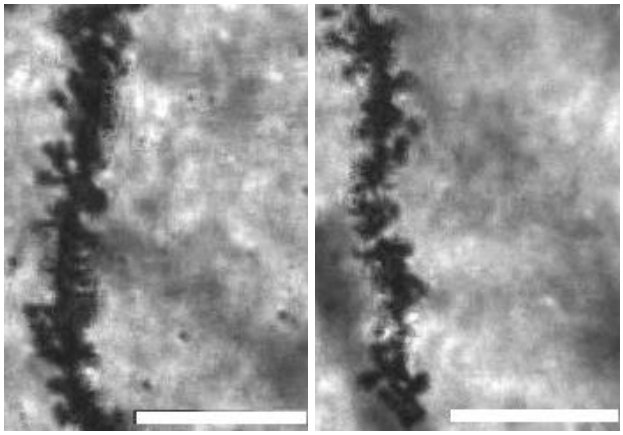
Die morphologischen Parameter Spinedichte, Spinelänge sowie Spinebreite des *Shank2/Shank3*-DKOs wurden entlang der apikalen Dendriten im Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus untersucht und anschließend mit den Parametern von Wildtypmäusen (P70 – P100) verglichen. Die Analyse erfolgte zwischen Bregma –1 mm und Bregma –2mm. Zur Analyse wurden pro Tier jeweils 10 Neurone betrachtet, sodass insgesamt 30 Neurone von n = 3 Tieren zur Verfügung standen. Pro Neuron wurden dabei jeweils 2 apikale Sekundärdendriten untersucht.

Die Spinedichte wurde in Spines pro µm angegeben. In der CA1-Region zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied in der Spinedichte zwischen den *Shank2/Shank3*-DKO-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen ($p = 0,88$, T-Test). Bei einem Mittelwert von 1,10 Spines/µm verteilen sich die Werte des Wildtyps zwischen 0,9 Spines/µm und 1,2 Spines/µm. Die Werte des *Shank2/Shank3*-DKOs verteilen sich auch zwischen 0,9 Spines/µm und 1,2 Spines/µm bei einem Mittelwert von 1,10 Spines/µm (Abbildung 6).

Die Spinelänge wurde in µm gemessen. Die Spinelänge des *Shank2/Shank3*-DKOs war hier im Vergleich zur Spinelänge der Wildtyp-Mäuse signifikant verkürzt ($p < 0,0001$, T-Test). Die Werte variieren beim Wildtyp zwischen 1 µm und 1,4 µm mit einem Mittelwert von 1,17 µm. Beim *Shank2/Shank3*-DKO hingegen liegen die Werte zwischen 0,8 µm und 1,2 µm bei einem Mittelwert von 1,02 µm. Der Vergleich der Mittelwerte ergibt eine Reduktion der Spinelänge des *Shank2/Shank3*-DKOs um etwa 13 % im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 7 und 8).

Die Spinebreite wurde ebenso in µm gemessen. Hier zeigte der Vergleich vom *Shank2/Shank3*-DKO mit dem Wildtyp keine Änderung der Spinebreite

(p = 0,07, Mann-Whitney-U-Test). Die Werte variieren beim Wildtyp zwischen 0,4 µm und 0,8 µm mit einem daraus resultierenden Mittelwert von 0,57 µm. Beim *Shank2/Shank3*-DKO liegen die Werte für die Spinebreite zwischen 0,4 µm und 0,6 µm. Der Mittelwert der Spinebreite liegt hier bei 0,5 µm (Abbildung 9 und 10).



**Wildtyp-Maus CA1** **DKO-Maus CA1**

**Abbildung 5. Dendritische Spines in der CA1-Region des Hippocampus der Wildtyp-Maus (links) und der DKO-Maus („Doppel-Knockout-Maus“, rechts).**

Repräsentative Ausschnitte von dendritischen Spines aus der CA1-Region des Hippocampus (Stratum radiatum). Die Schnitte wurden mittels der Golgi-Färbemethode erstellt. Der Messbalken entspricht 10 µm. DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Mausmodell).

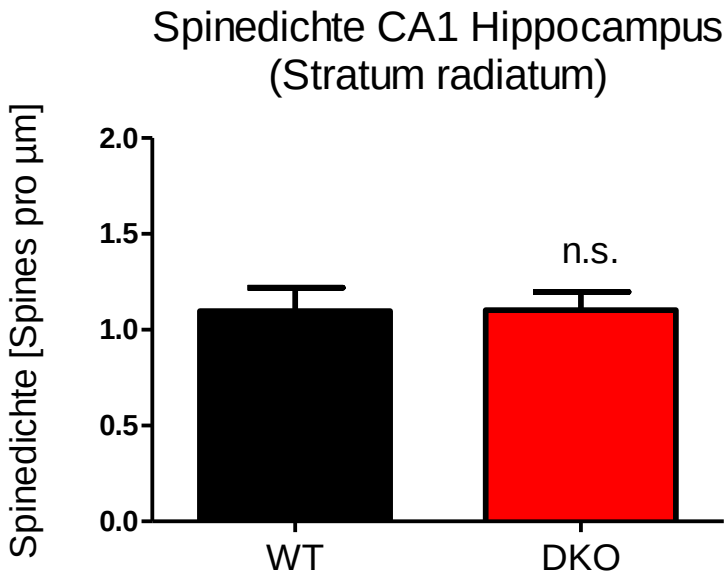



**Abbildung 6. Spinedichte von sekundären apikalen Dendriten der Pyramidenzellen im Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus.**

Aufgezeigt sind die Mittelwerte ± SEM (standard error of the mean, also Standardfehler des Mittelwertes) der Spinedichte des Wildtyps (schwarz) und des *Shank2/Shank3*-DKOs (rot). Im *Shank2/Shank3*-DKO zeigt sich keine signifikante Veränderung (1,10 ± 0,02 Spines pro µm) im Vergleich zur Spinedichte des Wildtyps (1,10 ± 0,02 Spines pro µm), n. s. (nicht signifikant): p = 0,88 im zweiseitigen T-Test, n = 30 Neurone pro Genotyp. Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet, pro Individuum 10 Neurone willkürlich ausgewählt. WT = Wildtyp-Maus, DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell).

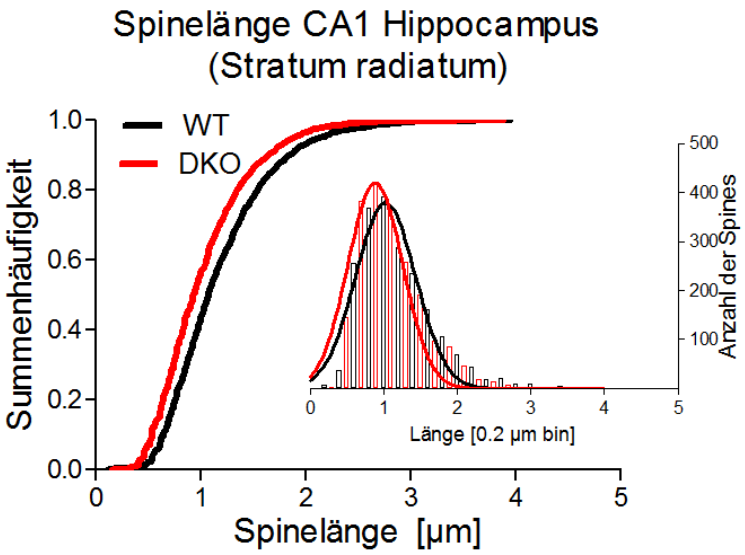



**Abbildung 7. Länge der Spines von sekundären Dendriten der Pyramidenzellen im Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus.**

Die Daten sind dargestellt in Form eines Summenhäufigkeitsplots. Der innere Graph zeigt die Gauß-Verteilung der einzelnen Werte. Das Diagramm zeigt die Verteilung der Spinelängen aller Spines in der CA1-Region des Hippocampus. N = 2024 Spines des Wildtyps (WT), N = 2041 Spines des *Shank2/Shank3*-DKOs (Doppel-Knockout). Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet. WT = Wildtyp-Maus (schwarz), DKO = „Doppel-Knock-out-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell, rot).

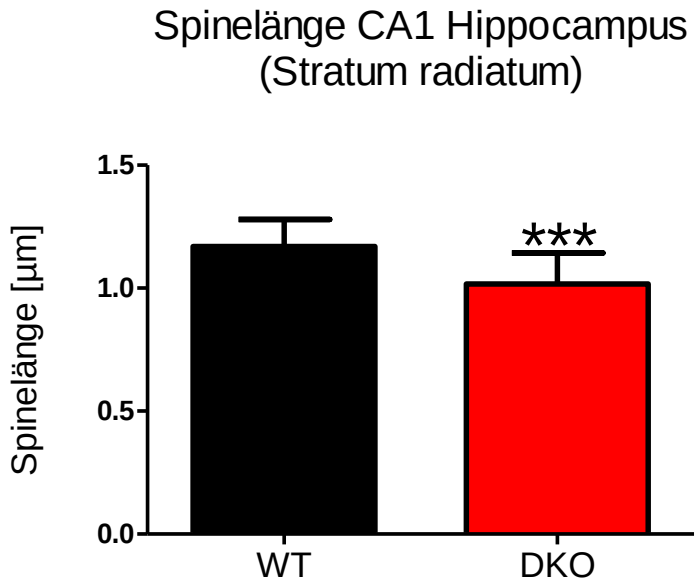



**Abbildung 8. Länge der Spines von sekundären apikalen Dendriten der Pyramidenzellen im Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus in µm.**

Aufgezeigt sind die Mittelwerte ± SEM (standard error of the mean, also Standardfehler des Mittelwertes) der Spinelänge des Wildtyps (schwarz) und des *Shank2/Shank3*- DKOs (rot). Der *Shank2/Shank3*-DKO zeigt eine signifikante Reduktion (1,02 ± 0,03 µm) der Spinelänge im Vergleich zur Spinelänge des Wildtyps (1,17 ± 0,02 µm), signifikant: $p < 0,0001$ im zweiseitigen T-Test, n = 30 Neurone pro Genotyp. Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet, pro Individuum 10 Neurone willkürlich ausgewählt. WT = Wildtyp-Maus, DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell).

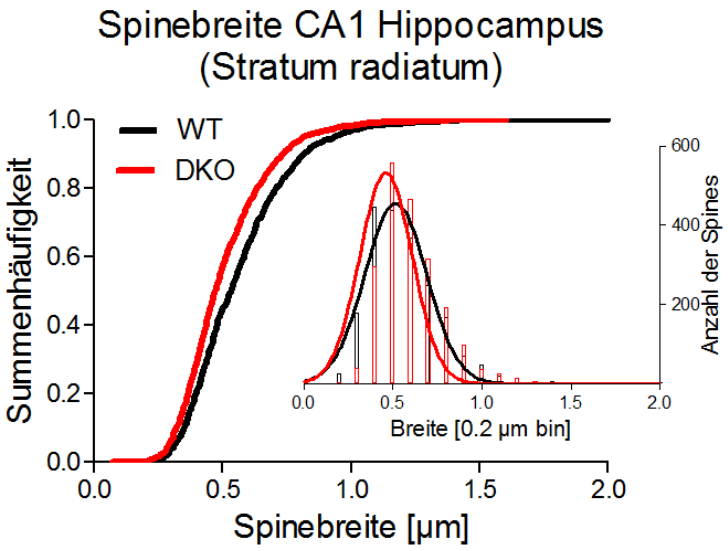



**Abbildung 9. Breite der Spines von sekundären apikalen Dendriten der Pyramidenzellen im Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus.**

Die Daten sind dargestellt in Form eines Summenhäufigkeitsplots. Der innere Graph zeigt die Gauß-Verteilung der einzelnen Werte. Das Diagramm zeigt die Verteilung der Spinebreiten aller Spines in der CA1-Region des Hippocampus. N = 2024 Spines des Wildtyps (WT), N = 2041 Spines des *Shank2/Shank3*-DKOs. Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet. WT = Wildtyp-Maus (schwarz), DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell, rot).

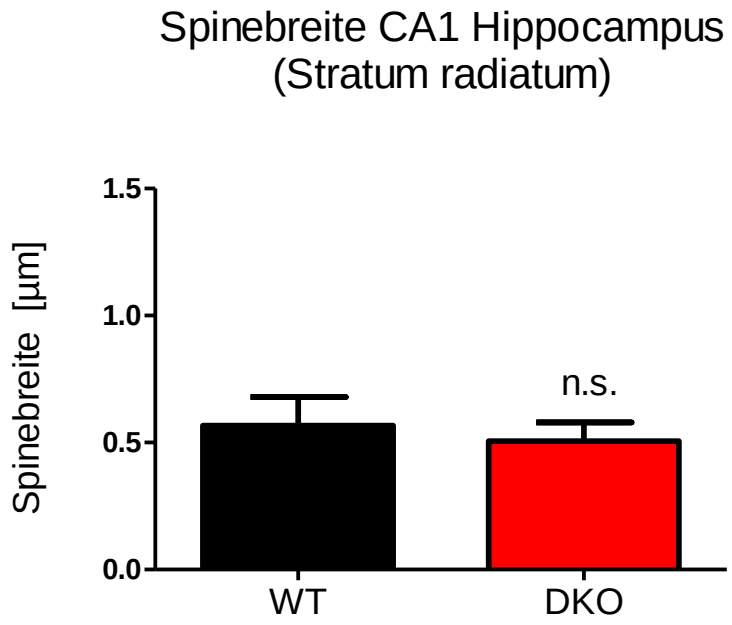



**Abbildung 10. Breite der Spines von sekundären apikalen Dendriten der Pyramidenzellen im Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus in µm.**

Aufgezeigt sind die Mittelwerte ± SEM (standard error of the mean, also Standardfehler des Mittelwertes) der Spinebreite des Wildtyps (schwarz) und des *Shank2/Shank3*-DKOs (rot). Der *Shank2/Shank3*-DKO zeigt eine nicht signifikante Reduktion (0,51 ± 0,01 µm) der Spinebreite im Vergleich zur Spinebreite des Wildtyps (0,57 ± 0,02 µm), n. s. (nicht signifikant): p = 0,07 im Mann-Whitney-U-Test, n = 30 Neurone pro Genotyp. Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet, pro Individuum 10 Neurone willkürlich ausgewählt. WT = Wildtyp-Maus, DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Mausmodell).

### 3.1.2 Dorsolaterales Striatum

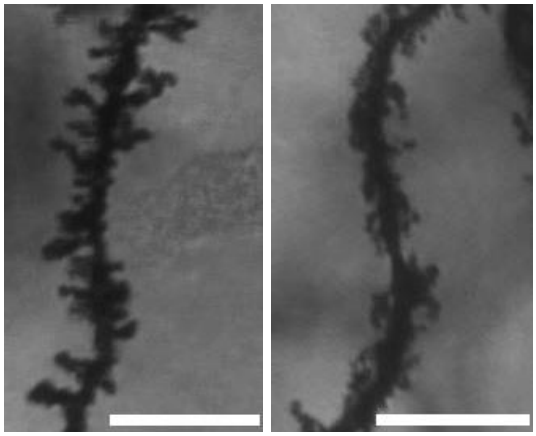
Im dorsolateralen Striatum (DLS) wurden ebenso wie im Stratum radiatum der hippocampalen CA1-Region die Parameter Spinedichte, Spinelänge sowie die Spinebreite zwischen dem *Shank2/Shank3*-DKO und Wildtyp-Mäusen gleichen Alters verglichen (P70 – P100). Als Orientierung wurde der Bereich zwischen dem Bregma 0 mm und dem Bregma -1 mm gewählt. Untersucht wurden n = 3 Tiere sowohl des Wildtyps als auch des *Shank2/Shank3*-DKOs. Pro Tier wurden im DLS insgesamt 10 Neurone (MSNs) mit jeweils zwei Sekundärdendriten pro Neuron analysiert.

Die Spinedichte wurde in Spines pro µm angegeben. Etwa 30 µm lange Dendriten dienten hierbei zur Messung der Spinedichte. Es zeigte sich in der Region des DLS kein signifikanter Unterschied in der Spinedichte zwischen den *Shank2/Shank3*-DKO-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen ($p = 0,22$, T-Test). Die Werte des Wildtyps verteilen sich zwischen 0,7 Spines/µm und 1,3 Spines/µm mit einem Mittelwert von 1,03 Spines/µm. Der Mittelwert des *Shank2/Shank3*-DKO beträgt 0,96 Spines/µm, wobei sich hier die Werte zwischen 0,5 Spines/µm und 1,3 Spines/µm verteilen (Abbildung 12).

Die Angabe der Spinelänge erfolgt in µm. Die Spinelänge des *Shank2/Shank3*-DKOs zeigte sich hier signifikant kürzer als die Spinelänge der Wildtyp-Mäuse ($p < 0,0001$, T-Test). Betrachtet man die Werte des Wildtyps, welche zwischen 1,2 µm und 2 µm liegen, ergibt sich ein Mittelwert von 1,65 µm. Beim *Shank2/Shank3*-DKO hingegen liegen die Werte zwischen 1,1 µm und 1,7 µm bei einem Mittelwert von 1,4 µm. Der Vergleich der Mittelwerte ergibt eine Reduktion der Spinelänge des *Shank2/Shank3*-DKOs um etwa 14 % im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 13 und Abbildung 14).

Die Spinebreite wurde ebenso in µm gemessen. Durch den Vergleich von den Wildtyp-Mäusen mit dem *Shank2/Shank3*-DKO wurde eine signifikante Reduktion der Spinebreite des *Shank2/Shank3*-DKOs im Vergleich zur Wildtyp-Maus ($p = 0,01$, Mann-Whitney-U-Test) festgestellt. Die Werte variieren beim Wildtyp zwischen 0,5 µm und 1,1 µm mit einem daraus resultierenden Mittelwert von 0,69 µm. Beim *Shank2/Shank3*- DKO liegen die Werte für die Spinebreite zwischen 0,3 µm und 1,0 µm, der daraus resultierende Mittelwert der Spinebreite beträgt 0,6 µm. Der Vergleich der Mittelwerte ergibt eine Reduktion der Spinebreite des *Shank2/Shank3*- DKOs im Vergleich zum Wildtyp um etwa 13 % (Abbildungen 15 und 16).

Generell scheint eine Verkürzung der Spinelänge und Spinebreite im *Shank2/Shank3-D*KO innerhalb des dorsolateralen Striatums vorzuliegen, während die Spinedichte jedoch unverändert bleibt.



**Wildtyp-Maus DLS** **DKO-Maus DLS**

**Abbildung 11. Dendritische Spines im dorsolateralen Striatum (DLS) der Wildtyp-Maus (links) und der DKO-Maus („Doppel-Knockout-Maus“, rechts).**

Repräsentative Ausschnitte von dendritischen Spines aus dem dorsolateralen Striatum. Verglichen wurde die Spinemorphologie des Wildtyps mit der Spinemorphologie des *Shank2/Shank3*-DKOs. Die Schnitte wurden mittels der Golgi-Färbemethode erstellt. Der Messbalken entspricht 10 µm. DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Mausmodell), DLS = dorsolaterales Striatum.

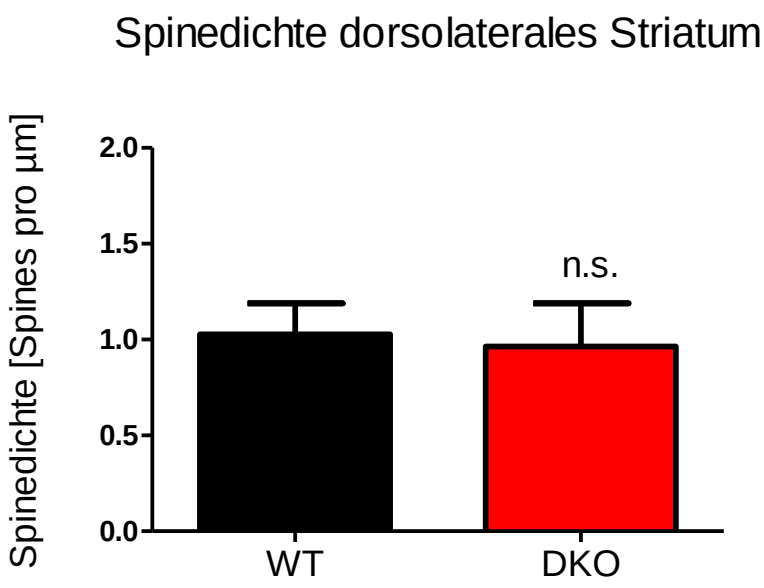



**Abbildung 12. Spinedichte der MSNs ("medium spiny neurons") im dorsolaterialen Striatum (DLS).**

Aufgezeigt sind die Mittelwerte ± SEM (standard error of the mean, also Standardfehler des Mittelwertes) der Spinedichte des Wildtyps (schwarz) und des *Shank2/Shank3*-DKOs (rot). Der *Shank2/Shank3*-DKO zeigt keine signifikante Veränderung (0,96 ± 0,04 Spines pro µm) im Vergleich zur Spinedichte des Wildtyps (1,03 ± 0,03 Spines pro µm), n. s. (nicht signifikant): $p > 0,05$ im zweiseitigen T-Test, n = 30 Neurone pro Genotyp. Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet, pro Individuum 10 Neurone willkürlich ausgewählt. WT = Wildtyp-Maus, DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell).

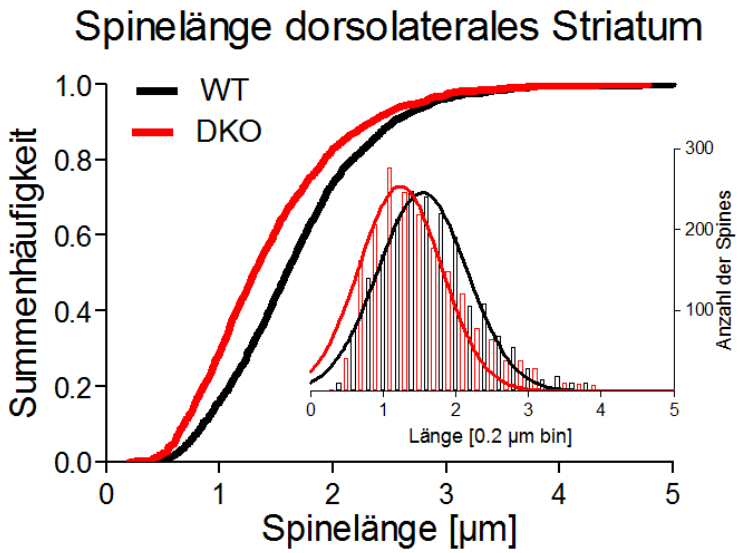



**Abbildung 13. Länge der Spines im dorsolateralen Striatum.**

Die Daten sind dargestellt in Form eines Summenhäufigkeitsplots. Der innere Graph zeigt die Gauß-Verteilung der einzelnen Werte. Das Diagramm zeigt die Verteilung der Spinelängen aller Spines im dorsolateralen Striatum. N = 1920 Spines des Wildtyps (WT), N = 1869 Spines des *Shank2/Shank3*-DKOs. Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet. WT = Wildtyp-Maus (schwarz), DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell, rot).

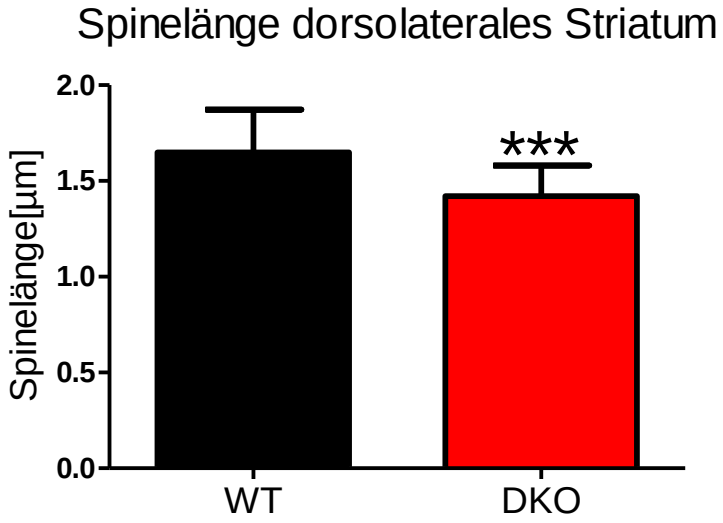



**Abbildung 14. Spinelänge der MSNs ("medium spiny neurons") des DLS (dorsolaterales Striatum) in µm.**

Aufgezeigt sind die Mittelwerte ± SEM (für „standard error of the mean“, also Standardfehler des Mittelwertes) der Spinelänge des Wildtyps (schwarz) und des *Shank2/Shank3*-DKOs (rot). Der *Shank2/Shank3*-DKO zeigt eine signifikante Reduktion (1,42 ± 0,03 µm) der Spinelänge im Vergleich zur Spinelänge des Wildtyps (1,65 ± 0,04 µm), signifikant: p <0,0001 im zweiseitigen T-Test, n = 30 Neurone pro Genotyp. Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet, pro Individuum 10 Neurone willkürlich ausgewählt. WT = Wildtyp-Maus, DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell).

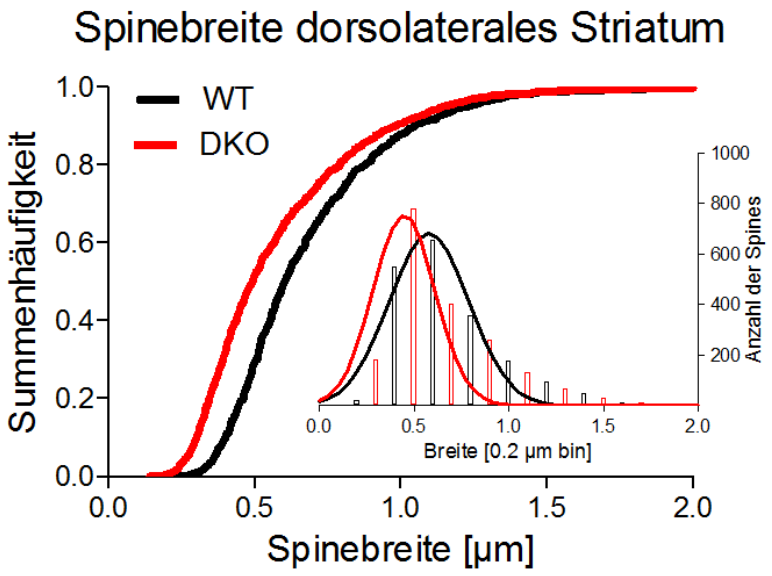



**Abbildung 15. Breite der Spines im dorsolateralen Striatum.**

Die Daten sind dargestellt in Form eines Summenhäufigkeitsplots. Der innere Graph zeigt die Gauß-Verteilung der einzelnen Werte. Das Diagramm zeigt die Verteilung der Spinebreiten aller Spines im dorsolateralen Striatum. N = 1920 Spines des Wildtyps (WT), N = 1869 Spines des *Shank2/Shank3*-DKOs. Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet. WT = Wildtyp-Maus (schwarz), DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell, rot).

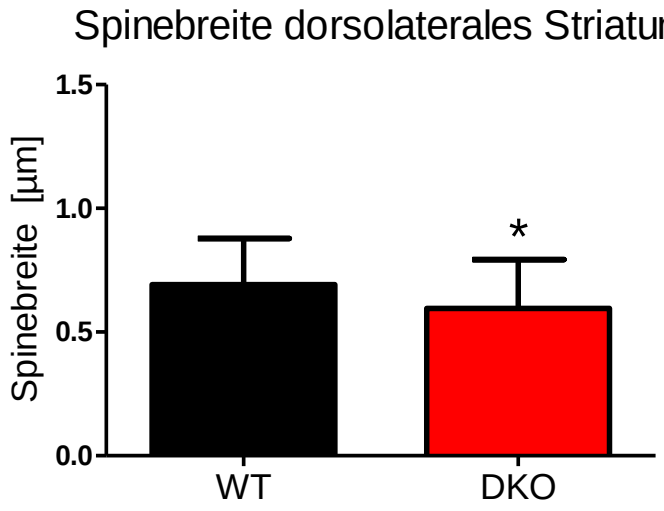



**Abbildung 16. Spinebreite der MSNs ("medium spiny neurons") im DLS (dorsolaterales Striatum) in µm.**

Aufgezeigt sind die Mittelwerte ± SEM (standard error of the mean, also Standardfehler des Mittelwertes) der Spinebreite des Wildtyps (schwarz) und des *Shank2/Shank3*-DKOs (rot). Der *Shank3/Shank3*-DKO zeigt eine leicht signifikante Reduktion (0,60 ± 0,04µm) der Spinebreite im Vergleich zur Spinebreite des Wildtyps (0,69 ± 0,03 µm), signifikant: p = 0,01 im Mann-Whitney-U-Test, n = 30 Neurone pro Genotyp. Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet, pro Individuum 10 Neurone willkürlich ausgewählt. WT = Wildtyp-Maus, DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell).

### 3.1.3 Dorsomediales Striatum

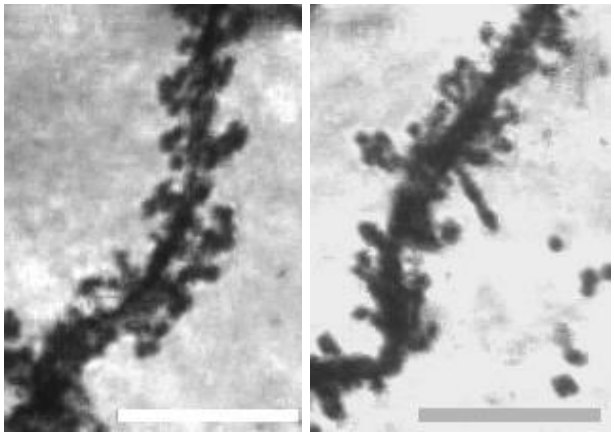
Im dorsomedialen Striatum (DMS) wurden ebenso wie im DLS und Hippocampus die Parameter Spinedichte, Spinelänge sowie die Spinebreite zwischen dem *Shank2/Shank3*-DKO und Wildtyp-Mäusen gleichen Alters (P70 – P100) zwischen Bregma 0 mm und Bregma -1 mm analysiert. Als Untersuchungsgrundlage dienten sowohl n = 3 Tiere des Wildtyps als auch n = 3 Tiere des *Shank2/Shank3*-DKOs. Pro Tier wurden im dorsomedialen Striatum insgesamt 10 Neurone (MSNs für medium spiny neurons) mit jeweils zwei Sekundärdendriten pro Neuron analysiert.

Als Einheit für die Spinedichte wurden Spines pro µm gewählt. Etwa 30 µm lange Dendriten dienten hierbei zur Messung der Spinedichte. Die Spinedichte zwischen dem *Shank2/Shank3*-DKO und den Wildtyp-Mäusen ist auch im DMS unverändert

(p = 0,30, Mann-Whitney-U-Test). Bei einem Mittelwert des Wildtyps von 1,09 Spines/µm, verteilen sich die Werte zwischen 0,8 Spines/µm und 1,4 Spines/µm. Der Mittelwert der Spinedichte des *Shank2/Shank3*-DKOs beträgt 1,02 Spines/µm, wobei sich hier die Werte zwischen 0,7 Spines/µm und 1,3 Spines/µm verteilen (Abbildung 18**)**.

Ebenfalls in µm erfolgte die Angabe der Spinelänge im DMS. Die Spinelänge des *Shank2-Shank3*-DKOs wies hierbei im Vergleich zum Wildtyp keine signifikante Veränderung auf (p = 0,39, T-Test). Betrachtet man die Werte des Wildtyps, welche zwischen 1,1 µm und 2,0 µm liegen, ergibt sich ein Mittelwert von 1,57 µm. Beim *Shank2/Shank3*-DKO hingegen liegen die Werte zwischen 1,2 µm und 1,9 µm bei einem Mittelwert von 1,51 µm (Abbildungen 19 und 20).

Die Spinebreite des dorsomedialen Striatums wurde in µm gemessen. Im *Shank2/Shank3*-DKO zeigen sich im Vergleich zu den Wildtypmäusen auch hinsichtlich ihrer Breite im dorsomedialen Striatum keine signifikanten Veränderungen auf (p = 0,79, T-Test). Die Spinebreite des Maus-Wildtyps hat einen Mittelwert von 0,66 µm, die Werte variieren zwischen 0,4 µm und 0,9 µm. Der *Shank2/Shank3*-DKO zeigt einen Mittelwert von 0,68 µm und um diesen Mittelwert variierende Werte zwischen 0,5 µm und 0,9 µm (Abbildungen 21 und 22).



**Wildtyp-Maus DMS** **DKO-Maus DMS**

**Abbildung 17. Dendritische Spines im dorsomedialen Striatum (DMS) der Wildtyp-Maus (links) und der DKO-Maus („Doppel-Knockout-Maus“, rechts).**

Repräsentative Ausschnitte von dendritischen Spines aus dem DMS. Verglichen wird die Spinemorphologie des Wildtyps mit der Spinemorphologie des *Shank2/Shank3*-DKOs. Die Schnitte wurden mittels der Golgi-Färbemethode erstellt. Der Messbalken entspricht 10 µm. DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Mausmodell), DMS = dorsomediales Striatum.

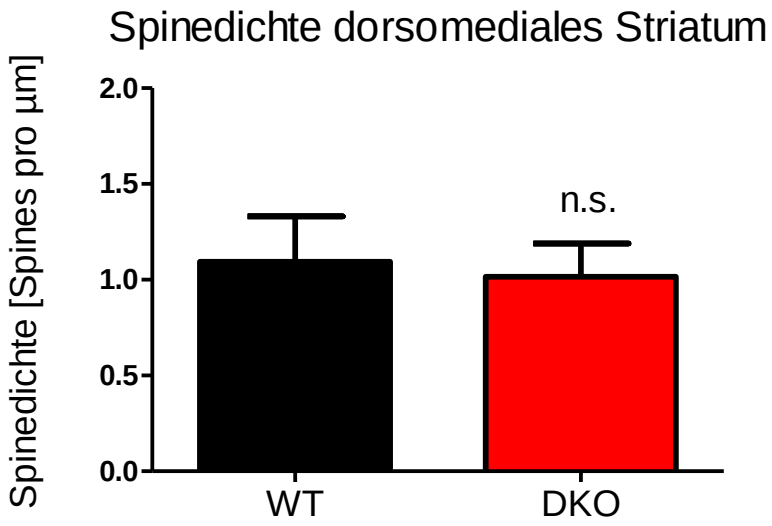



**Abbildung 18. Spinedichte der MSNs ("medium spiny neurons") im DMS (dorsomediales Striatum).**

Aufgezeigt sind die Mittelwerte ± SEM („standard error of the mean“, also Standardfehler des Mittelwertes) der Spinedichte des Wildtyps (schwarz) und des *Shank2/Shank3*-DKOs (rot). Der *Shank2/Shank3*-DKO zeigt keine signifikante Veränderung (1,02 ± 0,03 Spines pro µm) im Vergleich zur Spinedichte des Wildtyps (1,01 ± 0,04 Spines pro µm), n. s. (nicht signifikant): $p > 0,05$ im Mann-Whitney-U-Test, n = 30 Neurone pro Genotyp. Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet, pro Individuum 10 Neurone willkürlich ausgewählt. WT = Wildtyp-Maus, DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell).

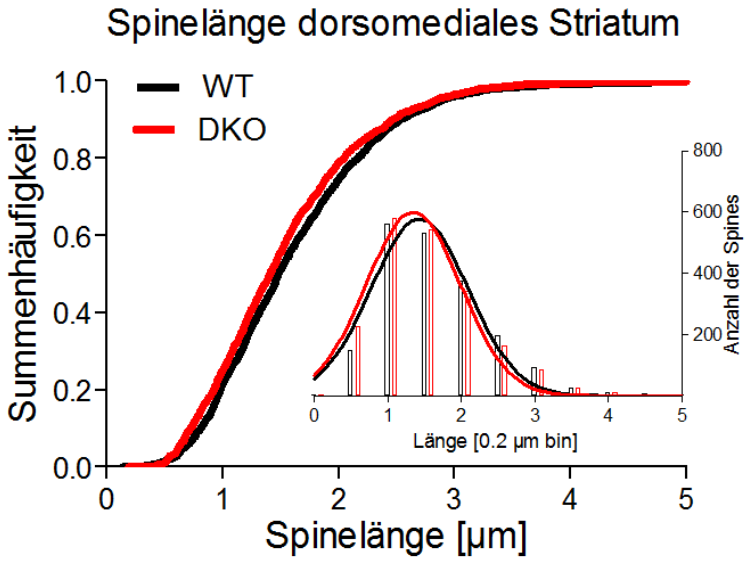



**Abbildung 19. Länge der Spines im dorsomedialen Striatum.**

Die Daten sind dargestellt in Form eines Summenhäufigkeitsplots. Der innere Graph zeigt die Gauß-Verteilung der einzelnen Werte. Das Diagramm zeigt die Verteilung der Spinelängen aller Spines im dorsomedialen Striatum. N = 1948 Spines des Wildtyps (WT), N = 1982 Spines des *Shank2/Shank3*- DKOs. Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet. WT = Wildtyp-Maus (schwarz), DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell, rot).

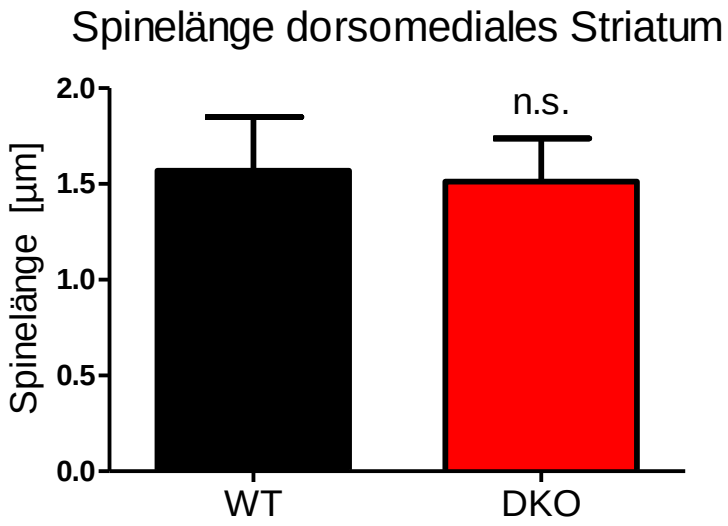



**Abbildung 20. Spinelänge der MSNs ("medium spiny neurons") des DMS (dorsomediales Striatum) in µm.**

Aufgezeigt sind die Mittelwerte ± SEM (standard error of the mean, also Standardfehler des Mittelwertes) der Spinelänge des Wildtyps (schwarz) und des *Shank2/Shank3*-DKOs (rot). Der *Shank2/Shank3*-DKO zeigt keine signifikante Reduktion (1,51 ± 0,04 µm) der Spinelänge im Vergleich zur Spinelänge des Wildtyps (1,57 ± 0,05 µm), n. s. (nicht signifikant): $p > 0,05$ im zweiseitigen T-Test, n = 30 Neurone pro Genotyp. Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet, pro Individuum 10 Neurone willkürlich ausgewählt. WT = Wildtyp-Maus, DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell).

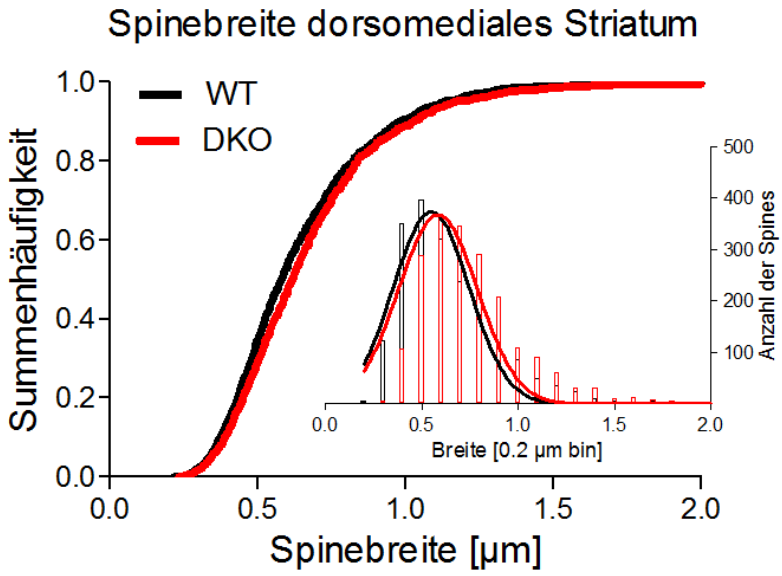



**Abbildung 21. Breite der Spines im dorsomedialen Striatum.**

Die Daten sind dargestellt in Form eines Summenhäufigkeitsplots. Der innere Graph zeigt die Gauß-Verteilung der einzelnen Werte. Das Diagramm zeigt die Verteilung der Spinebreiten aller Spines im dorsomedialen Striatum. N = 1948 Spines des Wildtyps (WT), N = 1981 Spines des *Shank2/Shank3*-DKOs. Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet. WT = Wildtyp-Maus (schwarz), DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell, rot).

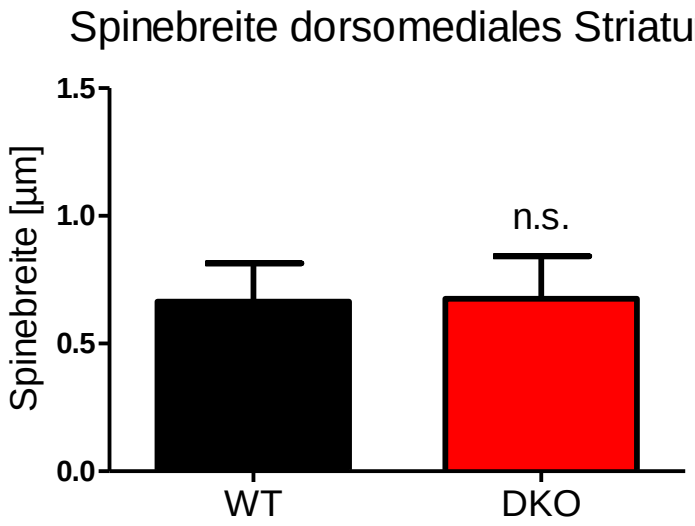



**Abbildung 22. Spinebreite der MSNs ("medium spiny neurons") im DMS (dorsomediales Striatum) in µm.**

Aufgezeigt sind die Mittelwerte ± SEM (standard error of the mean, also Standardfehler des Mittelwertes) der Spinebreite des Wildtyps (schwarz) und des *Shank2/Shank3*-DKOs. Die Spinebreite des *Shank2/Shank3*-DKOs (0,68 ± 0,03 µm) zeigt keine Veränderung im Vergleich zur Spinebreite des Maus-Wildtyps (0,66 ± 0,03µm), n. s. (nicht signifikant): $p > 0,05$ im zweiseitigen T-Test, n = 30 Neurone pro Genotyp. Pro Genotyp wurden 3 Individuen verwendet, pro Individuum 10 Neurone willkürlich ausgewählt. WT = Wildtyp-Maus, DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell).

### 3.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Spines im *Shank2/Shank3*-DKO in den analysierten Hirnregionen hinsichtlich der untersuchten Parameter Spinedichte, Spinelänge und Spinebreite je nach betroffener Hirnregion verschiedene Spinemorphologien aufweisen. So waren die Spines des *Shank2/Shank3*-DKOs im DMS im Vergleich zur Morphologie der Wildtyp-Maus unverändert. Die Spines in der CA1-Region des Hippocampus waren im Vergleich zur Wildtyp-Maus hinsichtlich der Spinedichte und Spinebreite ebenso unverändert, jedoch waren die Spines im *Shank2/Shank3*-DKO signifikant kürzer als in der Wildtyp-Maus. Die Spines innerhalb des DLS des *Shank2/Shank3*-DKOs konnten im Vergleich zur Wildtyp-Maus die deutlichste Veränderung aufweisen. So war die Spinedichte ebenso wie in den bereits aufgeführten Regionen unverändert, jedoch konnte aufgezeigt werden, dass

die Spines des *Shank2/Shank3*-DKOs in ihrer Länge und Breite signifikant reduziert waren.

Im Rahmen eines zusammenfassenden Schaubildes soll nachfolgend nochmals verdeutlicht werden, wie sich die Spines unseres DKOs in den analysierten Hirnregionen von den Spines des Wildtyps unterscheiden.

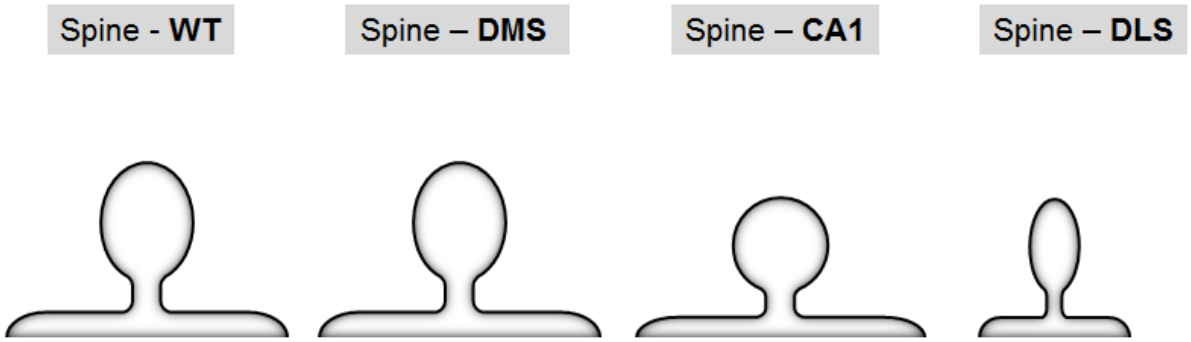



**Abbildung 23. Zusammenfassende Gegenüberstellung der Spinemorphologien im Wildtyp sowie in verschiedenen Hirnregionen des *Shank2/Shank3*-DKOs.**

Ausgehend vom Spine des Wildtyps (WT) stellt sich der Spine des DKOs im DMS morpologisch unverändert dar. Der Spine des DKOs in CA1 ist verkürzt, jedoch unverändert in seiner Breite. Der DKO-Spine des DLS ist im Vergleich zum WT-Spine verkürzt und weniger breit. WT = Wildtyp, DKO = „Doppel-Knockout-Maus“ (*Shank2/Shank3*-Maumodell), DMS = dorsomediales Striatum, CA1 = CA1-Region des Hippocampus, DLS = dorsolaterales Striatum.

# 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob die Parameter Dichte, Länge und Breite dendritischer Spines im adulten *Shank2/Shank3*-DKO im Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus sowie im dorsomedialen und dorsolateralen Striatum (DMS und DLS) im Vergleich zum Wildtyp verändert sind. Im DMS des *Shank2/Shank3*-DKOs war keiner dieser drei Parameter signifikant im Vergleich zum Wildtyp verändert. Dahingegen zeigten sich im DLS des *Shank2/Shank3*-DKOs die eindrücklichsten Veränderungen. Zwar war auch hier die Spinedichte unverändert, jedoch konnte festgestellt werden, dass die Spines des *Shank2/Shank3*-DKOs in dieser Hirnregion signifikant kürzer und dünner waren. Geringer ausgeprägte Veränderungen konnten für die CA1-Region des Hippocampus im *Shank2/Shank3*-DKO aufgezeigt werden. Während kein Einfluss auf die Spinedichte und die Spinebreite zu erkennen war, waren die Spines im Vergleich zum Wildtyp signifikant verkürzt.

## 4.1 Spinedichte

Wie bereits aufgeführt, konnten weder in der CA1-Region des Hippocampus noch im DMS oder DLS Veränderungen der Spinedichte im *Shank2/Shank3*-DKO-Mausmodell entdeckt werden.

### 4.1.1 Spinedichte in CA1

Unsere Ergebnisse hinsichtlich der Spinedichte in CA1 decken sich mit den bisherigen Erkenntnissen aus den unter 1.5 vorgestellten *in vivo*-Studien. Im Rahmen dieser Studien konnte bei Elimination aller bekannten Shank2-Isoformen nur ein geringer bis kein Einfluss des Shank2-Verlusts auf die Spinedichte festgestellt werden (Schmeisser et al. 2012; Won et al. 2012). Weitere, in diesem Zusammenhang ebenso aufgeführte *in vivo*-Studien, welche die Entwicklung der Spinedichte in

*Shank3*-Mutanten analysierten, konnten in der adulten Maus ebenso keine Veränderungen der Spinedichte in CA1 feststellen, wobei in keiner dieser Studien alle vorhandenen Shank3-Isoformen vollständig eliminiert wurden (Schmeisser et al. 2012; Wang et al. 2011; Kouser et al. 2013; Peca et al. 2011). Somit scheinen weder der vollständige Verlust von Shank2 noch der partielle Verlust von Shank3 *in vivo* in der adulten CA1-Region des Hippocampus der Maus in den bisher durchgeführten Analysen einen Effekt auf die Anzahl der Spines zu haben. Da Shank3 in den eben aufgeführten Studien jedoch niemals vollständig eliminiert wurde, lässt sich nicht generell feststellen, dass Shank3 keinen Einfluss auf die Spinedichte in CA1 hat.

### 4.1.2 Spinedichte im Striatum

In unserer Analyse des *Shank2/Shank3*-DKOs konnten wir keine Veränderungen der Spinedichte im DMS und im DLS feststellen. Beim Vergleich unserer Ergebnisse mit den aktuell in der Literatur relevanten Daten, ist festzuhalten, dass Peca et al. (2011) in deren *Shank3*-Mutante ebenso die Auswirkungen des Shank3-Verlusts auf die Spinedichte im dorsalen Striatum untersuchten. Hierbei wurden nach aktueller Literatur die Shank3-Isoformen Shank3a, Shank3b, Shank3c sowie Shank3d eliminiert (Jiang u. Ehlers 2013). Peca et al. (2011) untersuchten jedoch in ihrer Studie im Gegensatz zu unseren Analysen die Spines in der noch juvenilen Maus (P35). Hierbei konnte in deren *Shank3*-Mausmutante interessanterweise eine signifikante Reduktion der Spinedichte im dorsalen Striatum aufgezeigt werden. Der Unterschied zwischen unserem Ergebnis im *Shank2/Shank3*-DKO im Vergleich zu dem Ergebnis von Peca et al. (2011) könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass bei der Mutante von Peca et al. vergleichsweise mehr Shank3-Isoformen eliminiert wurden als in unserem *Shank2/Shank3*-DKO. Zum anderen könnten die jeweils unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkte der untersuchten Mäuse ursächlich sein (P35 vs. P70).

## 4.2 Spinelänge

Durch die Analyse der Spinelänge im *Shank2/Shank3*-DKO konnte aufgezeigt werden, dass die Spinelänge im DMS unverändert war, während die Spines im DLS signifikant verkürzt waren. Auch in der CA1-Region des Hippocampus waren die Spines verkürzt, jedoch weniger stark als im DLS. Im Folgenden wird dieses Ergebnis näher diskutiert.

### 4.2.1 Spinelänge in CA1

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir aufzeigen, dass die Spines im *Shank2/Shank3*-DKO in CA1 im Vergleich zum Wildtyp signifikant verkürzt waren. Bei näherer Betrachtung der bisher in der Literatur verfügbaren morphologischen Analysen dendritischer Spines in *Shank*-Mutanten in CA1, ist festzustellen, dass die Spinelänge im *Shank2*-Einzel-KO bisher nicht untersucht wurde. Dagegen existiert eine *in vivo*-Studie an einer *Shank3*-Mutante von Wang et al. (2011). Hier konnte sowohl bei der juvenilen Maus zum Zeitpunkt P28, als auch bei der adulten Maus zum Zeitpunkt P70 eine Verlängerung der Spines in CA1 festgestellt werden.

Wir vermuten, dass die Elimination von Shank2 möglicherweise ursächlich sein könnte für die signifikante Verkürzung der Spines, welche wir im Rahmen dieser Arbeit in unserem *Shank2/Shank3*-DKO identifizierten. Möglicherweise waren die Spines in der Studie von Wang et al (2011) durch eine fehlende Elimination von Shank2 und durch die definierte Elimination bestimmter Shank3-Proteinisoformen verlängert.

### 4.2.2 Spinelänge im Striatum

Unsere Analysen konnten interessanterweise unterschiedliche Effekte im *Shank2/Shank3*-DKO hinsichtlich der Spinelänge im Striatum aufzeigen. Während die Spinelänge im DLS signifikant reduziert war, war diese im DMS unverändert.

Möglicherweise sind diese Subregion-spezifischen Unterschiede der Spinelängenverkürzung im dorsalen Striatum der *Shank2/Shank3*-DKO auch auf eine unterschiedlich starke Expression von Shank2 und Shank3 im DMS und DLS zurückzuführen. Es wurde bislang nicht untersucht, aber Shank2 und Shank3 könnten durchaus stärker im DLS als im DMS exprimiert sein, weshalb wir in unserem *Shank2/Shank3*-DKO deutlichere morphologische Effekte nach Elimination beider Shanks erkennen können.

Die bisher einzige weitere *in vivo*-Untersuchung dieses Parameters im Striatum ergab in der entsprechenden *Shank3*-Mausmutante eine unveränderte Spinelänge, wobei hier das gesamte dorsale Striatum analysiert wurde, ohne es in DLS und DMS zu unterteilen. Weiterhin fand die Analyse zu einem früheren Entwicklungszeitpunkt, nämlich an P35 statt. Zudem wurde in dieser *Shank3*-Mutante eine Shank3-Isoform mehr als in unserem Modell eliminiert, was möglicherweise auch zu den unterschiedlichen Ergebnissen beitragen könnte (Peca et al. 2011).

## 4.3 Spinebreite

In unserem *Shank2/Shank3*-DKO konnten wir hinsichtlich des Parameters der Spinebreite eine leicht signifikante Reduktion der Spinebreite im DLS feststellen, während die Spinebreite im DMS und in CA1 unverändert war. Betrachtet man die bereits aufgeführten Ergebnisse zur Entwicklung der Spinelänge in unserem *Shank2/Shank3*-DKO, kann man erkennen, dass auch hinsichtlich der Spinebreite der stärkste Effekt im DLS zu erkennen ist. Vorweg ist anzumerken, dass wir unter dem im Weiteren aufgeführten Begriff der „Spinebreite“ die Breite des Spinekopfes verstehen.

### 4.3.1 Spinebreite in CA1

In unserem *Shank2/Shank3*-DKO konnten wir keine signifikante Reduktion der Spinebreite in CA1 feststellen. Bei näherer Betrachtung der aktuell verfügbaren *in vivo*-Studien, welche sich mit dem Einfluss der Shank-Familie auf die Spinebreite beschäftigt haben, kommt man zu dem Schluss, dass die Spinebreite *in vivo* bisher nur selten Gegenstand der aktuell verfügbaren Analysen war. Im *Shank2*-Einzel-KO existieren *in vivo* aktuell keine weiteren Analysen der Spinebreite. Dagegen konnten Wang et al. (2011) in ihrer *Shank3*-Mutante im adulten Entwicklungsstadium der Maus bei Messung der Spinekopfgröße in CA1 keine Veränderung feststellen. Es ist davon auszugehen, dass die unveränderte Spinekopfgröße sehr wahrscheinlich auch mit einer relativ stabilen Spinekopfbreite einhergehen könnte.

Da wir in unserer *in vivo*-Studie im *Shank2/Shank3*-DKO in der CA1-Region des Hippocampus ebenfalls lediglich eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion der Spinebreite feststellen konnten, vermuten wir, dass Shank2 und Shank3 auf die Entwicklung der Spinebreite in CA1 kaum einen Einfluss haben. Es könnte jedoch möglich sein, dass, ähnlich wie in der Studie von Peca et al. (2011), welche im dorsalen Striatum durchgeführt wurde, die Breite des Spineskopfes zwar unverändert bleibt, sich dafür aber der Spinehals kompensatorisch verbreitert. Da wir uns im Rahmen unserer Studie jedoch ausschließlich der Entwicklung der Spinebreite des Spineskopfes gewidmet haben, ist diesbezüglich derzeit eine weitere Aussage nicht möglich. Somit stellt die Analyse der Entwicklung der Breite des Spineshalses im *Shank2/Shank3*-DKO eine mögliche Komponente im Rahmen zukünftiger Studien dar.

### 4.3.2 Spinebreite im Striatum

Im Rahmen der Analyse der Spinebreite in unserem *Shank2/Shank3*-DKO konnten wir eine leicht signifikante Reduktion der Spinebreite im DLS erkennen, während sich die Spinebreite im DMS unverändert darstellte. Interessanterweise war im *Shank2/Shank3*-DKO auch die Spinelänge im DLS reduziert, während im DMS

keine Veränderungen der Spinelänge festzustellen war (siehe Punkt 4.2.2). Insgesamt scheinen somit im *Shank2/Shank3*-DKO die Spines im DLS allesamt kleiner zu sein, während die Spines im DMS morphologisch unverändert sind.

Eine *in vivo*-Studie zur Analyse der Spinebreite im dorsalen Striatum wurde von Peca et al. (2011) durchgeführt. Hier konnte in deren *Shank3*-Mutante ein unveränderter Durchmesser des Spineskopfes festgestellt werden. Wie schon im Rahmen der Diskussion der Spinedichte sowie der Spinelänge müssen hier jedoch drei Aspekte berücksichtigt werden: Peca et al. (2011) untersuchten das gesamte dorsale Striatum ohne Unterteilung in DLS und DMS, deren Analysezeitpunkt war deutlich früher in der postnatalen Hirnentwicklung (P35) und es wurde eine Shank3-Isoform mehr als in unserem Modell eliminiert (Peca et al. 2011).

## 4.4 Schlussfolgerung

Unsere morphologischen Analysen beschäftigten sich mit dem Einfluss von Shank2 und Shank3 auf die Spinemorphologie in CA1, im DLS und im DMS. Durch die Analyse unserer Daten sowie durch den Vergleich mit den bisher aktuell verfügbaren Studien, kommen wir zu dem Schluss, dass Shank2 und Shank3 in den genannten Hirnregionen keinen unmittelbaren Einfluss auf die Spinedichte zu haben scheinen. Allerdings postulieren wir, dass beide Moleküle vor allem im DLS sehr wohl die Parameter Spinelänge und Spinebreite beeinflussen können.

Zum Einfluss von Shank3 auf die Spinemorphologie kann keine generelle Aussage getroffen werden, sondern es müssen vielmehr einige weitere Faktoren berücksichtigt werden. So gehen wir basierend auf unseren und den Studien anderer Gruppen davon aus, dass Shank3 die Spinemorphologie je nach Entwicklungszeitpunkt des Gehirns unterschiedlich stark beeinflussen könnte, da die Expression von Shank3 einer äußerst komplexen Regulation während der Reifung des Gehirns unterliegt. Weiterhin übernehmen die aktuell bekannten Shank3-Proteinisoformen hinsichtlich der Entwicklung der Spinemorphologie unterschiedliche, zum Teil konträre Funktionen und sind in verschiedenen Hirnregionen über die postnatale Entwicklung hinweg unterschiedlich stark exprimiert (Wang et al. 2014).

Interessant wäre die Analyse der Spinemorphologie in einem Mausmodell, in welchem alle Shank3-Isoformen deletiert sind. So konnten Han et al. (2013) in ihrem Überexpressionsmodell feststellen, dass es in der CA1-Region des Hippocampus zu einer signifikanten Erhöhung der Spinedichte kommt, wenn alle Shank3-Isoformen gleichzeitig um etwa die Hälfte erhöht werden. Dagegen könnte eine Deletion aller vorhandenen Shank3-Isoformen im umgekehrten Sinn mutmaßlich zu einer starken Reduktion der Spinedichte führen.

Insgesamt könnten die vorwiegend im DLS und in CA1 identifizierten kleineren Spines unseres *Shank2/Shank3*-DKOs Folgen für die synaptische Plastizität haben. So wurde im Rahmen des Punktes 1.3 der Einleitung bereits darauf eingegangen, dass die Morphologie der dendritischen Spines unmittelbar mit der Funktion der exzitatorischen Synapse zusammenhängt, da kleinere Spines auch über eine kleinere synaptische Übertragungsfläche verfügen. Dies führt zu einer geringeren synaptischen Übertragung, da ein Zusammenhang zwischen Spinemorphologie und molekularer Regulation der synaptischen Übertragung besteht (van Spronsen u. Hoogenraad 2010). Die Spinemorphologie hat unter anderem Einfluss auf die Regulation der glutamatergen Rezeptoren, den membranösen Transport und somit letztlich auf die synaptische Erregbarkeit und Übertragung (Bourne u. Harris 2008). So konnte in einer weiterführenden Studie aufgezeigt werden, dass eine Störung der synaptischen Plastizität auf morphologischer und somit auch auf molekularer Ebene unter anderem zu einem starken Angstverhalten sowie Verhaltensstereotypien führt. Dies sind einige der für ASD typischen Verhaltensweisen (Sarowar et al. 2016).

Die deutlichste Veränderung der Spinemorphologie konnten wir in unserem Mausmodell im DLS aufzeigen. Das DLS erhält Inputs vom sensomotorischen Kortex und steht somit in Zusammenhang mit motorischen Bewegungsabläufen (Kunzle 1975; Ragsdale u. Graybiel 1981; Liles u. Updyke 1985; McGeorge u. Faull 1989). Die Störung von motorischen Bewegungsabläufen, beispielsweise im Sinne von repetitiven Bewegungen, welche ebenso typisch für ASD sind, könnte somit auf die Störung der synaptischen Übertragung insbesondere im DLS zurückzuführen sein.

So komplex die Effekte der Shank-Familienmitglieder auf die Spinemorphologie sind, so heterogen stellen sich auch die Ergebnisse auf molekularer und verhaltensbiologischer Ebene in den *Shank*-Mausmodellen dar. Dies ist mitunter auf die in den vorgestellten Studien doch sehr verschieden aufgebauten Studienmodelle mit verschiedenen Mutationsansätzen zurückzuführen.

# 5. Zusammenfassung

Unter der Bezeichnung „Autismus-Spektrum-Störungen“ (ASS bzw. ASD) versteht man neuronale Entwicklungsstörungen, welche nach DSM-V hauptsächlich durch Defizite in der sozialen Interaktion und Kommunikation sowie repetitive und stereotype Verhaltensweisen gekennzeichnet sind. Diese Defizite manifestieren sich bei den betroffenen Personen in der Regel bereits innerhalb der ersten drei Lebensjahre. Als ursächlich für diese neuronale Entwicklungsstörung wurden bereits multiple genetische Ursachen entdeckt. Mitunter spielen Mutationen der sogenannten SHANK-Proteinfamilie (SH3 domain and ankyrin repeat-containing proteins) hier eine wichtige Rolle. Die SHANKs, welche alternativ auch als PROSAPs (proline-rich synpase-associated proteins) bezeichnet werden können, setzen sich aus den Unterformen SHANK1, PROSAP1/SHANK2 sowie PROSAP2/SHANK3 zusammen.

Hierbei handelt es sich um Gerüstproteine, welche in der sogenannten neuronalen postsynaptischen Dichte aufzufinden sind und durch ihre Protein-Protein-Interaktionsdomänen Verbindungen mit dem Zytoskelett aufbauen. Im Rahmen neurobiologischer Studien konnten bereits vielfältige Einflüsse der Shank-Proteinfamilie auf die Morphologie dendritischer Spines in verschiedenen Modellsystemen festgestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Morphologie dendritischer Spines unter gleichzeitiger Elimination von Shank2 und Shank3 im *Shank2/Shank3*-DKO (DKO bedeutet „Doppel-Knockout“) untersucht. Analysiert wurden die Parameter Spinedichte, Spinelänge und Spinebreite in der CA1-Region des Hippocampus sowie im dorsomedialen (DMS) und dorsolateralen (DLS) Striatum. Zur Färbung der Spines wurde eine modifizierte Golgi-Methode verwendet (FD Rapid GolgiStain Kit).

Es zeigten sich regionenspezifische Effekte. Die Spinemorphologie im DMS erwies sich als absolut unverändert, während die Spinelänge und die Spinebreite im DLS signifikant reduziert waren. In der CA1-Region des Hippocampus konnten wir ebenso eine signifikante Reduktion der Spinelänge erkennen.

Insgesamt konnten wir somit im *Shank2/Shank3*-DKO die deutlichsten morphologischen Effekte im DLS aufzeigen, gefolgt von weniger starken Effekten in der CA1-

Region des Hippocampus, während die Spines im DMS morphologisch unverändert waren. Dies lässt den Schluss aufkommen, dass es nach Verlust von *Shank2* und *Shank3* zu hirnregionspezifischen Veränderungen der Spinemorphologie kommt. Die Veränderung der Spinemorphologie hat einen Einfluss auf die synaptische Plastizität. So ist zu vermuten, dass die synaptische Übertragung und Erregbarkeit im Rahmen der veränderten Spinemorphologie reduziert sein könnten. Die Störung der synaptischen Übertragung im DLS sowie in CA1 in unserem *Shank2/Shank3*-DKO könnte für einen Teil der typischen ASD-Verhaltensweisen verantwortlich sein. Hierzu gehören vor allem Störungen im Sozialverhalten sowie motorische Stereotypien.

# 6. Literaturverzeichnis

1. Albin R L, Young A B, Penney J B: The functional anatomy of basal ganglia disorders. Trends in neurosciences, 12: 366-375 (1989)

2. American Psychiatric Association: Autism spectrum disorder. In: American Psychiatric Association (Hrsg) Diagnostic and statistical manual of mental disorders. DSM-5. 5. Auflage, American Psychiatric Association, Arlington, VA, S. 50-51 (2013)

3. Baird G, Simonoff E, Pickles A, Chandler S, Loucas T, Meldrum D, Charman T: Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames: the Special Needs and Autism Project (SNAP). Lancet, 368: 210-215 (2006)

4. Baron M K, Boeckers T M, Vaida B, Faham S, Gingery M, Sawaya M R, Salyer D, Gundelfinger E D, Bowie J U: An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density. Science (New York, N.Y.), 311: 531-535 (2006)

5. Berkel S, Marshall C R, Weiss B, Howe J, Roeth R, Moog U, Endris V, Roberts W, Szatmari P, Pinto D, Bonin M, Riess A, Engels H, Sprengel R, Scherer S W, Rappold G A: Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. Nature genetics, 42: 489-491 (2010)

6. Boeckers T M: The postsynaptic density. Cell and tissue research, 326: 409-422 (2006)

7. Boeckers T M, Bockmann J, Kreutz M R, Gundelfinger E D: ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. Journal of neurochemistry, 81: 903-910 (2002)

8. Boeckers T M, Mameza M G, Kreutz M R, Bockmann J, Weise C, Buck F, Richter D, Gundelfinger E D, Kreienkamp H J: Synaptic scaffolding proteins in rat brain. Ankyrin repeats of the multidomain Shank protein family interact with the cytoskeletal protein alpha-fodrin. The Journal of biological chemistry, 276: 40104-40112 (2001)

9. Boeckers T M, Winter C, Smalla K H, Kreutz M R, Bockmann J, Seidenbecher C, Garner C C, Gundelfinger E D: Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family. Biochemical and biophysical research communications, 264: 247-252 (1999)

10. Bonaglia M C, Giorda R, Borgatti R, Felisari G, Gagliardi C, Selicorni A, Zuffardi O: 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: 261-268 (2001)

11. Bonhoeffer T, Yuste R: Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. Neuron, 35: 1019-1027 (2002)

12. Bourne J N, Harris K M: Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. Annual Review of Neuroscience, 31: 47-67 (2008)

13. Bozdagi O, Sakurai T, Papapetrou D, Wang X, Dickstein D L, Takahashi N, Kajiwara Y, Yang M, Katz A M, Scattoni M L, Harris M J, Saxena R, Silverman J L, Crawley J N, Zhou Q, Hof P R, Buxbaum J D: Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. Molecular autism, 1: 15-2392-1-15 (2010)

14. Bredt D S, Nicoll R A: AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. Neuron, 40: 361-379 (2003)

15. Chen J, Yu S, Fu Y, Li X: Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders. Frontiers in cellular neuroscience, 8: 276 (2014)

16. Chih B, Afridi S K, Clark L, Scheiffele P: Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. Human molecular genetics, 13: 1471-1477 (2004)

17. Crawley J N: Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. Mental retardation and developmental disabilities research reviews, 10: 248-258 (2004)

18. DeLong M R: Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. Trends in neurosciences, 13: 281-285 (1990)

19. Devlin B, Scherer S W: Genetic architecture in autism spectrum disorder. Current opinion in genetics & development, 22: 229-237 (2012)

20. Du Y, Weed S A, Xiong W C, Marshall T D, Parsons J T: Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. Molecular and cellular biology, 18: 5838-5851 (1998)

21. Dudanova I, Tabuchi K, Rohlmann A, Sudhof T C, Missler M: Deletion of alpha-neurexins does not cause a major impairment of axonal pathfinding or synapse formation. The Journal of comparative neurology, 502: 261-274 (2007)

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

23. Durkin M S, Maenner M J, Newschaffer C J, Lee L C, Cunniff C M, Daniels J L, Kirby R S, Leavitt L, Miller L, Zahorodny W, Schieve L A: Advanced parental age and the risk of autism spectrum disorder. American Journal of Epidemiology, 168: 1268-1276 (2008)

24. Ey E, Leblond C S, Bourgeron T: Behavioral profiles of mouse models for autism spectrum disorders. Autism research: official journal of the International Society for Autism Research, 4: 5-16 (2011)

25. FD Neurotechnologies Inc.: Material Safety Data Sheet. Letzte Aktualisierung im Jahr 2013. http://fdneurotech.com/docs/1334071088.msds-pk401-2012-1.pdf (30.10.2016)

26. FD Neurotechnologies Inc.: FD Rapid GolgiStain Kit. A complete Golgi-Cox staining system for the study of the morphology of neurons and glia. Letzte Aktualisierung im Jahr 2012. http://static.bioport.cn/data/upload/product/specification/451/1461741214529_451872.pdf (22.11.2016)

27. Garner C C, Nash J, Huganir R L: PDZ domains in synapse assembly and signalling. Trends in cell biology, 10: 274-280 (2000)

28. Goldstein S, Schwebach A J: The comorbidity of Pervasive Developmental Disorder and Attention Deficit Hyperactivity Disorder: results of a retrospective chart review. Journal of Autism and Developmental Disorders, 34: 329-339 (2004)

29. Grabrucker A M, Knight M J, Proepper C, Bockmann J, Joubert M, Rowan M, Nienhaus G U, Garner C C, Bowie J U, Kreutz M R, Gundelfinger E D, Boeckers T M: Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation. The EMBO journal, 30: 569-581 (2011)

30. Gundelfinger E D, Boeckers T M, Baron M K, Bowie J U: A role for zinc in postsynaptic density asSAMbly and plasticity? Trends in biochemical sciences, 31: 366-373 (2006)

31. Haeckel A, Ahuja R, Gundelfinger E D, Qualmann B, Kessels M M: The actin-binding protein Abp1 controls dendritic spine morphology and is important for spine head and synapse formation. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 28: 10031-10044 (2008)

32. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, Miller J, Fedele A, Collins J, Smith K, Lotspeich L, Croen L A, Ozonoff S, Lajonchere C, Grether J K, Risch N: Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. Archives of General Psychiatry, 68: 1095-1102 (2011)

33. Han K, Holder J L,Jr, Schaaf C P, Lu H, Chen H, Kang H, Tang J, Wu Z, Hao S, Cheung S W, Yu P, Sun H, Breman A M, Patel A, Lu H C, Zoghbi H Y: SHANK3 overexpression causes manic-like behaviour with unique pharmacogenetic properties. Nature, 503: 72-77 (2013)

34. Hayashi M K, Tang C, Verpelli C, Narayanan R, Stearns M H, Xu R M, Li H, Sala C, Hayashi Y: The postsynaptic density proteins Homer and Shank form a polymeric network structure. Cell, 137: 159-171 (2009)

35. Hung A Y, Futai K, Sala C, Valtschanoff J G, Ryu J, Woodworth M A, Kidd F L, Sung C C, Miyakawa T, Bear M F, Weinberg R J, Sheng M: 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: 1697-1708 (2008)

36. Hutsler J J, Zhang H: Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. Brain research, 1309: 83-94 (2010)

37. Jiang Y H, Ehlers M D: Modeling autism by SHANK gene mutations in mice. Neuron, 78: 8-27 (2013)

38. Kim E, Sheng M: PDZ domain proteins of synapses. Nature reviews.Neuroscience, 5: 771-781 (2004)

39. Kleijer K T, Schmeisser M J, Krueger D D, Boeckers T M, Scheiffele P, Bourgeron T, Brose N, Burbach J P: Neurobiology of autism gene products: towards pathogenesis and drug targets. Psychopharmacology, 231: 1037-1062 (2014)

40. Kouser M, Speed H E, Dewey C M, Reimers J M, Widman A J, Gupta N, Liu S, Jaramillo T C, Bangash M, Xiao B, Worley P F, Powell C M: 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: 18448-18468 (2013)

41. Kunzle H: Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in Macaca fascicularis. Brain research, 88: 195-209 (1975)

42. Kwon C H, Luikart B W, Powell C M, Zhou J, Matheny S A, Zhang W, Li Y, Baker S J, Parada L F: Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. Neuron, 50: 377-388 (2006)

43. Langen M, Bos D, Noordermeer S D, Nederveen H, van Engeland H, Durston S: Changes in the Development of Striatum Are Involved in Repetitive Behavior in Autism. Biological psychiatry, (2013)

44. Leblond C S, Nava C, Polge A, Gauthier J, Huguet G, Lumbroso S, Giuliano F, Stordeur C, Depienne C, Mouzat K, Pinto D, Howe J, Lemiere N, Durand C M, Guibert J, Ey E, Toro R, Peyre H, Mathieu A, Amsellem F, Rastam M, Gillberg I C, Rappold G A, Holt R, Monaco A P, Maestrini E, Galan P, Heron D, Jacquette A, Afenjar A, Rastetter A, Brice A, Devillard F, Assouline B, Laffargue F, Lespinasse J, Chiesa J, Rivier F, Bonneau D, Regnault B, Zelenika D, Delepine M, Lathrop M, Sanlaville D, Schluth-Bolard C, Edery P, Perrin L, Tabet A C, Schmeisser M J, Boeckers T M, Coleman M, Sato D, Szatmari P, Scherer S W, Rouleau G A, Betancur C, Leboyer M, Gillberg C, Delorme R, Bourgeron T: Meta-analysis of SHANK

Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. PLoS genetics, 10: e1004580 (2014)

45. Liles S L, Updyke B V: Projection of the digit and wrist area of precentral gyrus to the putamen: relation between topography and physiological properties of neurons in the putamen. Brain research, 339: 245-255 (1985)

46. Lim S, Naisbitt S, Yoon J, Hwang J I, Suh P G, Sheng M, Kim E: 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: 29510-29518 (1999)

47. Lim S, Sala C, Yoon J, Park S, Kuroda S, Sheng M, Kim E: Sharpin, a novel postsynaptic density protein that directly interacts with the shank family of proteins. Molecular and cellular neurosciences, 17: 385-397 (2001)

48. McGeorge A J, Faull R L: The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. Neuroscience, 29: 503-537 (1989)

49. Miller M, Peters A: Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. The Journal of comparative neurology, 203: 555-573 (1981)

50. Moreno-De-Luca A, Myers S M, Challman T D, Moreno-De-Luca D, Evans D W, Ledbetter D H: Developmental brain dysfunction: revival and expansion of old concepts based on new genetic evidence. Lancet neurology, 12: 406-414 (2013)

51. Naisbitt S, Kim E, Tu J C, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg R J, Worley P F, Sheng M: Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. Neuron, 23: 569-582 (1999)

52. Peca J, Feliciano C, Ting J T, Wang W, Wells M F, Venkatraman T N, Lascola C D, Fu Z, Feng G: Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. Nature, 472: 437-442 (2011)

53. Penzes P, Cahill M E, Jones K A, VanLeeuwen J E, Woolfrey K M: Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. Nature neuroscience, 14: 285-293 (2011)

54. Peters A, Kaiserman-Abramof I R: The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. The American Journal of Anatomy, 127: 321-355 (1970)

55. Qualmann B, Boeckers T M, Jeromin M, Gundelfinger E D, Kessels M M: Linkage of the actin cytoskeleton to the postsynaptic density via direct interactions of Abp1 with the ProSAP/Shank family. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 24: 2481-2495 (2004)

56. Ragsdale C W,Jr, Graybiel A M: The fronto-striatal projection in the cat and monkey and its relationship to inhomogeneities established by acetylcholinesterase histochemistry. Brain research, 208: 259-266 (1981)

57. Sala C, Piech V, Wilson N R, Passafaro M, Liu G, Sheng M: Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. Neuron, 31: 115-130 (2001)

58. Sarowar T, Grabrucker S, Fohr K, Mangus K, Eckert M, Bockmann J, Boeckers T M, Grabrucker A M: Enlarged dendritic spines and pronounced neophobia in mice lacking the PSD protein RICH2. Molecular brain, 9: 28-016-0206-6 (2016)

59. Sato D, Lionel A C, Leblond C S, Prasad A, Pinto D, Walker S, O'Connor I, Russell C, Drmic I E, Hamdan F F, Michaud J L, Endris V, Roeth R, Delorme R, Huguet G, Leboyer M, Rastam M, Gillberg C, Lathrop M, Stavropoulos D J, Anagnostou E, Weksberg R, Fombonne E, Zwaigenbaum L, Fernandez B A, Roberts W, Rappold G A, Marshall C R, Bourgeron T, Szatmari P, Scherer S W: SHANK1 Deletions in Males with Autism Spectrum Disorder. American Journal of Human Genetics, 90: 879-887 (2012)

60. Schmeisser M J, Ey E, Wegener S, Bockmann J, Stempel A V, Kuebler A, Janssen A L, Udvardi P T, Shiban E, Spilker C, Balschun D, Skryabin B V, Dieck S, Smalla K H, Montag D, Leblond C S, Faure P, Torquet N, Le Sourd A M, Toro R, Grabrucker A M, Shoichet S A, Schmitz D, Kreutz M R, Bourgeron T, Gundelfinger E D, Boeckers T M: Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. Nature, 486: 256-260 (2012)

61. Sheng M, Kim E: The Shank family of scaffold proteins. Journal of cell science, 113 ( Pt 11): 1851-1856 (2000)

62. Silverman J L, Turner S M, Barkan C L, Tolu S S, Saxena R, Hung A Y, Sheng M, Crawley J N: Sociability and motor functions in Shank1 mutant mice. Brain research, 1380: 120-137 (2011)

63. Silverman J L, Yang M, Lord C, Crawley J N: Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. Nature reviews.Neuroscience, 11: 490-502 (2010)

64. Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T, Baird G: Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, 47: 921-929 (2008)

65. Sudhof T C: Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. Nature, 455: 903-911 (2008)

66. Tavazoie S F, Alvarez V A, Ridenour D A, Kwiatkowski D J, Sabatini B L: Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. Nature neuroscience, 8: 1727-1734 (2005)

67. Tu J C, Xiao B, Naisbitt S, Yuan J P, Petralia R S, Brakeman P, Doan A, Aakalu V K, Lanahan A A, Sheng M, Worley P F: Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. Neuron, 23: 583-592 (1999)

68. Tu J C, Xiao B, Yuan J P, Lanahan A A, Leoffert K, Li M, Linden D J, Worley P F: Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. Neuron, 21: 717-726 (1998)

69. van Spronsen M, Hoogenraad C C: Synapse pathology in psychiatric and neurologic disease. Current neurology and neuroscience reports, 10: 207-214 (2010)

70. Wang X, McCoy P A, Rodriguiz R M, Pan Y, Je H S, Roberts A C, Kim C J, Berrios J, Colvin J S, Bousquet-Moore D, Lorenzo I, Wu G, Weinberg R J, Ehlers M D, Philpot B D, Beaudet A L, Wetsel W C, Jiang Y H: Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. Human molecular genetics, 20: 3093-3108 (2011)

71. Wang X, Xu Q, Bey A L, Lee Y, Jiang Y H: 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: 30-2392-5-30. eCollection 2014 (2014)

72. Wilson H L, Wong A C, Shaw S R, Tse W Y, Stapleton G A, Phelan M C, Hu S, Marshall J, McDermid H E: Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. Journal of medical genetics, 40: 575-584 (2003)

73. Wohr M, Roullet F I, Hung A Y, Sheng M, Crawley J N: Communication impairments in mice lacking Shank1: reduced levels of ultrasonic vocalizations and scent marking behavior. PloS one, 6: e20631 (2011)

74. Won H, Lee H R, Gee H Y, Mah W, Kim J I, Lee J, Ha S, Chung C, Jung E S, Cho Y S, Park S G, Lee J S, Lee K, Kim D, Bae Y C, Kaang B K, Lee M G, Kim E: Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. Nature, 486: 261-265 (2012)

75. Won H, Mah W, Kim E: Autism spectrum disorder causes, mechanisms, and treatments: focus on neuronal synapses. Frontiers in molecular neuroscience, 6: 19 (2013)

# Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

# Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.