

# Die Rolle des postsynaptischen Gerüstproteins Shank1 in der Pathogenese des Fragilen X-Syndroms

---

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

des Departments Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sabine Luise Kramp

Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. S. KINDLER  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. M. KNEUSSEL  
Tag der Disputation: 19. April 2013

Hamburg, den 04. April 2013



Professor Dr. C. Lohr  
Vorsitzender des  
Fach-Promotionsausschusses Biologie

# INHALT

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>5</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>8</b>
1.1 Das Fragile X-Syndrom.....	8
1.2 Neurone und Synapsen.....	12
1.3 Die postsynaptische Dichte.....	13
1.4 Die mGluR-Theorie.....	15
1.5 Ziel der Arbeit.....	17
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1 Materialien.....	18
2.1.1 Chemikalien.....	18
2.1.2 Labortiere.....	18
2.1.3 Antikörper.....	18
2.1.4 Oligonukleotide.....	19
2.2 Zucht der Versuchsmäuse, Körper- und Testesgewicht.....	20
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.3.1 Präparation genomischer DNA.....	21
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	22
2.4 Proteinchemische Methoden.....	22
2.4.1 PSD-Präparation.....	22
2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	22
2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	23
2.4.4 Western Blot-Analysen.....	23

2.5	Zellbiologische Methoden.....	24
2.5.1	Präparation und Kultivierung primärer Cortexneurone.....	24
2.5.2	Gewinnung von Proteinlysaten aus kultivierten Neuronen.....	24
2.6	Histologische Methoden.....	25
2.6.1	Golgi-Cox-Färbung.....	25
2.6.2	Mikroskopische Analyse dendritischer Dornen.....	25
2.7	Verhaltensbiologische Methoden.....	26
2.7.1	<i>Open Field</i> .....	26
2.7.2	<i>Elevated Plus Maze</i> .....	27
2.7.3	<i>Y-Maze</i> .....	27
2.7.4	<i>Social Interaction</i> .....	27
2.7.5	<i>Fear Conditioning</i> .....	28
2.7.6	<i>Inhibitory Avoidance Extinction</i> .....	29
2.8	Statistische Auswertung.....	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
3.1	Genotypisierung der Versuchsmäuse.....	31
3.2	Erzeugung der <i>Fmr1-Shank1</i> -Mäuse.....	32
3.3	Verifizierung der Reduktion der Shank1-Proteinkonzentration.....	32
3.4	Juveniles Körpergewicht.....	33
3.5	Testesgewicht.....	34
3.6	Akustisch ausgelöste Krampfanfälle.....	35
3.7	Analyse dendritischer Dornen mittels Golgi-Cox-Färbung.....	36
3.7.1	Dornendichte.....	38
3.7.2	Dornenmorphologie.....	39
3.8	<i>Open Field</i> .....	45

3.9	<i>Y-Maze</i> .....	48
3.10	<i>Elevated Plus Maze</i> .....	50
3.11	<i>Social Interaction</i> .....	51
3.12	<i>Fear Conditioning</i> .....	54
3.13	<i>Inhibitory Avoidance Extinction</i> .....	56
3.14	Quantitative Analyse von Shank1 in allen Genotypen .....	58
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>60</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Vortrag und Poster</b> .....	<b>93</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>94</b>

## ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
A	Adenin-Nukleotid/Ampere
as	<i>antisense</i>
Abp1	<i>actin binding protein 1</i>
AMPA	<i>amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATG	Adenin-Thymin-Guanin-Startcodon
<i>et al.</i>	<i>et alia</i>
bp	Basenpaare
β-Pix	<i>PAAK-interactive exchange factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin-Nukleotid
ca.	circa
C57BL/6J	<i>C57 Black 6/J</i>
CA1	cortical area 1
CamKinaseII	<i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependant proteinkinase II</i>
cm	Zentimeter
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
d	<i>donkey</i>
dB	Dezibel
ECL	<i>enhanced chemiluminiscence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	<i>Fmr1<sup>(-/y)</sup>Shank1<sup>(+/+)</sup>-Mäuse aus Verpaarung FB x S</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
FB	<i>Fmr1<sup>(-/y)</sup>Shank1<sup>(+/+)</sup>-Mäuse der Linie B6.129P2</i>
FMR1	humanes <i>Fragile X Mental Retardation-Gen 1</i>
Fmr1	murines <i>Fragile X Mental Retardation-Gen 1</i>
FMRP	<i>Fragile X Mental Retardation Protein</i>
FS	<i>Fmr1<sup>(-/y)</sup>Shank1<sup>(+/+)</sup>-Mäuse aus Verpaarung FB x S</i>
FVB	<i>friend virus B-type</i>
fwd	<i>forward</i>

FXS	Fragiles X-Syndrom
g	Erdbeschleunigung/Gramm/ <i>goat</i>
G	Guanin-Nukleotid
gp	<i>guinea pig</i>
gp1 mGluR	<i>group 1 metabotropic glutamate receptor</i>
h	Stunde
I	Isoleucin
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
InsP <sub>3</sub> R	Inositol-1,2,5-triphosphat-Rezeptor
IRSp53	Insulinrezeptor-Substrat p53
kD	Kilodalton
KH	<i>hnRNP-K-homology</i>
KO	Knockout
l	Liter
LTD	<i>long term depression</i>
LTP	<i>long term potentiation</i>
m	Meter/ <i>mouse</i>
M	molar, Mol/Liter
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
N	Asparagin/ <i>numerus</i> ; Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NES	<i>nuclear exchange signal</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale Nitritoxid-Synthase
NP40	4-Noniphenolpolyethylenglycol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline</i> mit Tween
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDZ	<i>PSD-95/Discs-large/ZO-1</i>

PGK	<i>phosphoglycerine kinase</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus d. Wasserstoff-Protonen-Konzentration
PSD	postsynaptische Dichte
PSD-95	<i>postsynaptic density protein 95 kDa</i>
QM	Qualitätsmanagement
rb	<i>rabbit</i>
rev	<i>reverse</i>
RGG	Arginin-Glycin-Glycin-Wiederholungen
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
s	Sekunde/sense
S	<i>Fmr1<sup>(+/y)</sup>Shank1<sup>(+/-)</sup>-Mäuse</i>
SAM	<i>sterile alpha motif</i>
SAPAP	<i>synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SER	smooth endoplasmatic reticulum / weiches endoplasmatisches Retikulum
SH3	<i>Src homology 3 domain</i>
Shank	<i>SH3 domain and ankyrin repeat containing protein</i>
SPAR	<i>spine-associated RapGAP</i>
SynGAP	<i>synaptic Ras GTPase-activating protein</i>
T	Thymin-Nukleotid
u. a.	unter anderem
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultra-Violett
V	Volt
VTH	Versuchstierhaltung
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp-Mäuse
Xq27.3	Bande 27.3 des langen Arm des X-Chromosoms
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DAS FRAGILE X-SYNDROM

Das Fragile X-Syndrom (FXS) wurde erstmals 1943 von J. Purdon Martin und Julia Bell anhand einer Familie mit elf mental retardierten Individuen beschrieben und in früheren Jahren auch als Martin-Bell- oder Marker X-Syndrom bezeichnet (Martin & Bell 1943). Heute ist bekannt, dass das Fragile X-Syndrom nach dem Down-Syndrom die zweithäufigste genetische Ursache für eine mentale Retardierung ist. Die Inzidenz variiert zwischen verschiedenen Studien und wird mit 1:2500 bis 1:6000 angegeben (Pesso *et al.* 2000, Crawford *et al.* 2002, Fernandez-Carvajal *et al.* 2009, Willemsen *et al.* 2011). Während das Down-Syndrom zwar eine genetische, aber in der Regel nicht ererbte Erkrankung darstellt, gehört das Fragile X-Syndrom zu den erblich bedingten Trinukleotiderkrankungen, denen eine anomale Expansion von Basentriplett-Wiederholungen zugrunde liegt (La Spada & Taylor 2010, McMurray 2010). Beim FXS liegt eine Expansion eines repetitiven Abschnitts des *Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1)*-Gens vor (Verkerk *et al.* 1991, Willemsen *et al.* 2011). *FMR1* umfasst einen 38 Kilobasen großen Bereich am Ende des langen Arms des X-Chromosoms in der Bande 27.3. Es besteht aus 17 Exons und führt zu einer 4,4 Kilobasen großen mRNA. Während von einem Cytosin-Guanin-Guanin-(CGG)-Triplett in Exon 1 bei einer gesunden Person 5-50 direkt aufeinanderfolgende Kopien vorliegen, besitzen FXS-Betroffene über 200 CGG-Motive. Dies geht einher mit einer Methylierung von Cytosinresten in der expandierten Region und den angrenzenden Bereichen, wovon auch die Promotorregion betroffen ist (Sutcliffe *et al.* 1992, Hwu *et al.* 1993). Dadurch wird die Transkription des Gens inhibiert und das Genprodukt, das *Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP)*, wird nicht gebildet. Bei FXS-Betroffenen lässt sich weder das Protein FMRP noch die entsprechende mRNA nachweisen (Pieretti *et al.* 1991, Tassone & Hagerman 2003). Zusätzlich führt die Methylierung zu einer veränderten Kondensierung der genomischen DNA während der Metaphase, sodass der entsprechende Bereich am Ende des X-Chromosoms bei mikroskopischer Betrachtung „zerbrechlich“ erscheint (Abbildung 1-1, A). Dies ist bereits früh in zytogenetischen Untersuchungen aufgefallen und war für die Erkrankung namensgebend (Lubs 1969).

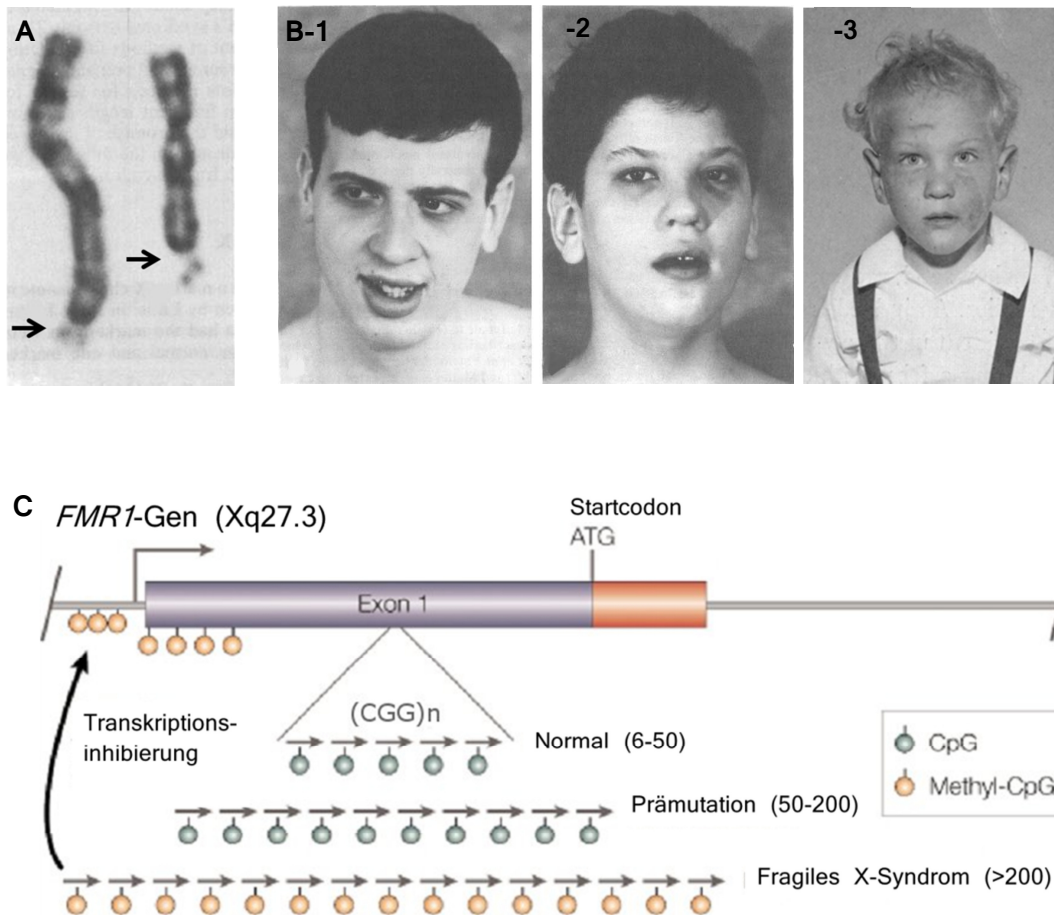


Abbildung 1-1. Das Fragile X-Syndrom. [A] X-Chromosomen von FXS-Patienten in der Metaphase. Die Pfeile kennzeichnen die durch eine veränderte Kondensierung fragil aussehenden Bereiche (Brown *et al.*, 2006). [B] Faziale Auffälligkeiten bei FXS. Typisch sind ein längliches Gesicht mit einer hohen Stirn und einer prominenten Kinnregion, sowie große, fleischige Ohren und Nase. B-1: ein 17-jähriger Patient. B-2: ein 12-jähriger Patient. B-3: ein 3-jähriger Patient (Brown *et al.*, 2006; Lubs, 1969). [C] Das Fragile X-Syndrom wird durch eine erhöhte Anzahl von CGG-Tripletts (durch Pfeile veranschaulicht) in Exon 1 (durch blaue Box veranschaulicht) des *FMR1*-Gens verursacht. Infolge einer Methylierung kommt es nicht zur Transkription des Gens. CpG steht für die Cytosinphosphatidyl-Guanin-Verknüpfungen. Modifiziert nach Robertson und Wolffe, 2000.

1994 stellte ein Konsortium aus belgischen und niederländischen Forschern eine *Fmr1*-Knockout-Mauslinie vor. Bei diesen Mäusen ist das *Fmr1*-Gen durch das Einfügen einer Neomycin-Kassette derart verändert, dass es zwar teilweise transkribiert, das Protein FMRP aber nicht gebildet wird (Consortium 1994). Damit fehlt den *Fmr1*-Knockout-Mäusen, ebenso wie den betroffenen Menschen, das Protein FMRP. Dieses ist zwischen Mensch und Maus zu 97 % identisch (Ashley *et al.* 1993b). Für die *Fmr1*-Knockout-Maus wurden diverse phänotypische Auffälligkeiten beschrieben, die teilweise den Symptomen der FXS-Patienten ähneln. So wurde bei FMRP-defizienten Mäusen passend zur bei Menschen beobachteten mentalen

Retardierung (Oostra & Halley 1995) eine schlechtere Lern- und Gedächtnisleistung festgestellt (Consortium 1994, D'Hooge *et al.* 1997, Dobkin *et al.* 2000, Mineur *et al.* 2002, Baker *et al.* 2010). Die betroffenen Menschen zeigen außerdem faziale Auffälligkeiten (Abbildung 1-1, B) und ein überdurchschnittliches juveniles Wachstum und Gewicht (Oostra & Halley 1995). In Übereinstimmung hiermit wurde auch bei FMRP-defizienten Mäusen ein erhöhtes juveniles Gewicht gefunden (Consortium 1994, Dölen *et al.* 2007). Sowohl betroffene Männer als auch Mausböcke haben vergrößerte Hoden (Turner *et al.* 1980, Oostra & Halley 1995, Consortium 1994). Zudem findet man bei betroffenen Menschen Hyperaktivität, Epilepsie und Symptome aus dem Autismus-Spektrum (Oostra & Halley 1995), und dazu passend bei den *Fmr1*-Knockout-Mäusen eine erhöhte Aktivität (Consortium 1994) und Krampfanfälligkeit (Chen & Toth 2001) sowie Defizite im Sozialverhalten (Mineur *et al.* 2006, Dahlhaus & El-Husseini 2010). Bei histologischen Untersuchungen des Gehirns einiger weniger Betroffener wurden spezifische morphologische Veränderungen an Neuronen festgestellt (Rudelli *et al.* 1985, Hinton *et al.* 1991, Irwin *et al.* 2001), welche auch bei FMRP-defizienten Mausneuronen gefunden wurden (Comery *et al.* 1997, Nimchinsky *et al.* 2001, McKinney *et al.* 2005). Aufgrund der gleichartigen biochemischen Situation von FXS-Patienten und *Fmr1*-Knockout-Mäusen – ihnen fehlt jeweils das Protein FMRP – und den daraus resultierenden ähnlichen Phänotypen werden die FMRP-defizienten Mäuse als Mausmodell der Erkrankung betrachtet.

Während es beim Menschen bei über 200 CGG-Motiven zur Ausbildung zuvor genannter Symptome kommt, werden 50-200 Wiederholungen des CGG-Tripletts als Prämutation bezeichnet. Dabei kommt es im Erwachsenenalter zu Ataxien und bei weiblichen Trägern zu einer früh einsetzenden Menopause (Oostra & Willemsen 2009). Während die übliche Anzahl von 5-50 Triplettwiederholungen stabil vererbt wird, kann es bei weiblichen Trägern der sogenannten Prämutation aufgrund einer fehlerhaften DNA-Replikation bei der Meiose zu einer Ausdehnung der repetitiven Region kommen, sodass Nachkommen von FXS betroffen sein können. Ein männlicher Träger vererbt die Prämutation dagegen unverändert an seine Nachkommen (Fu *et al.* 1991, Oberle *et al.* 1991, Richards & Sutherland 1994, Eichler *et al.* 1994). Die Anzahl der Triplettwiederholungen korreliert mit der Schwere der Symptome bzw. bei der Prämutation auch mit dem Alter der Manifestation der Erkrankung. Dies ist für Trinukleotiderkrankungen typisch und wird als Antizipation bezeichnet (Korneluk & Narang 1997).

Das den FXS-Betroffenen fehlende Protein FMRP besteht aus 631 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 78 kD (Abbildung 1-2). Es ist bei Menschen und Mäusen hauptsächlich in Hoden und im Gehirn nachweisbar (Devys *et al.* 1993, Hinds *et al.* 1993), wo man es vorrangig in Neuronen des Hippocampus, des zerebralen Cortex und des Cerebellums findet (Abitbol *et al.* 1993, Hinds *et al.* 1993). FMRP liegt hauptsächlich zytoplasmatisch vor (Verheij *et al.* 1993, Tamanini *et al.* 1996) und in Neuronen findet man es auch in den als Dendriten bezeichneten Zellausläufern (Castren *et al.* 2001). Auch im Nukleus kann man FMRP nachweisen (Willemsen *et al.* 1996). Mit Hilfe eines nukleären Lokalisationssignals (NLS) für die Rekrutierung in den Nukleus sowie eines nukleären Exportsignals (NES) für einen Export aus dem Kern heraus, kann FMRP zwischen Zellkern und Zytoplasma wechseln (Eberhart *et al.* 1996). FMRP besitzt RNA-Bindemotive in Form von zwei KH-Motiven sowie einer Arginin/Glycin-reichen Region (RGG-Box) (Siomi *et al.* 1993, Ashley *et al.* 1993a). Hierüber bindet es etwa 4 % aller Transkripte im Gehirn (Ashley *et al.* 1993a). Die Fähigkeit, mRNA zu binden ist elementar. Wenn durch eine I304N-Aminosäuresubstitution die RNA-Bindefähigkeit gestört wird, kommt es gleichsam zur Ausprägung des FXS-Phänotyps (Siomi *et al.* 1994, Feng *et al.* 1997a).

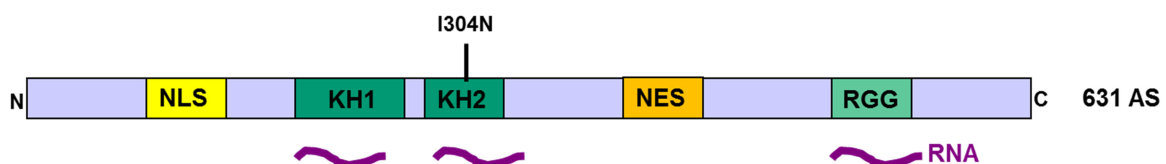
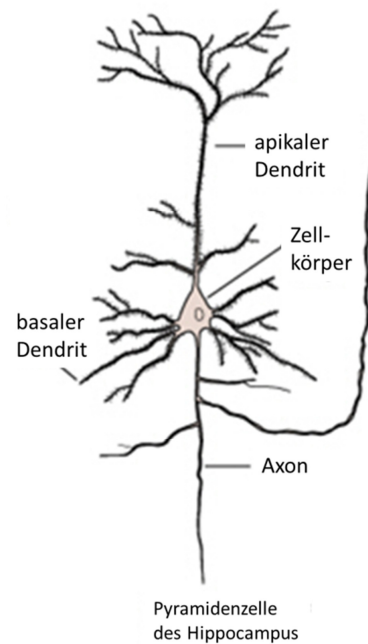


Abbildung 1-2. Schematische Darstellung des *Fragile X Mental Retardation Protein* (FMRP). FMRP verfügt neben einem nukleären Lokalisationssignal (NLS, gelber Bereich) und einem nukleären Exportsignal (NES, oranger Bereich) über RNA-Bindemotive in Form von zwei KH-Domänen (dunkelgrüne Bereiche) und einer RGG-Box (hellgrüner Bereich). Die I304N-Aminosäuresubstitution verändert die KH2-Domäne und führt, wie das Fehlen von FMRP, zur Ausprägung des FXS-Phänotyps.

## 1.2 NEURONE UND SYNAPSEN

Ein Neuron ist aus einem Zellkörper und seinen Ausläufern, dem Axon und den Dendriten, aufgebaut (Abbildung 1-3). Die Dendriten empfangen über Synapsen Signale von anderen Neuronen und leiten sie zum Zellkörper weiter. Der Bereich, an dem das Axon vom Zellkörper ausgeht, wird als Axonhügel bezeichnet. Hier kann eine regenerative Depolarisation der Membran erzeugt werden, welche als Aktionspotential bezeichnet wird und sich aktiv in Richtung des Axonendes bis zum sogenannten präsynaptischen Endköpfchen ausbreitet. Am Ende des Axons erreicht das Aktionspotential wiederum eine Synapse (Kandel *et al.* 2000).

Synapsen sind spezialisierte Kontaktzonen zwischen Neuronen und dienen der Signalübertragung. Dabei kann man als Folge der Übertragungsrichtung des Signals jeweils das prä- und das postsynaptische Neuron unterscheiden. Bei chemischen Synapsen erfolgt die interzelluläre Signalweitergabe durch Moleküle, welche als Neurotransmitter bezeichnet werden. Wenn ein Aktionspotential die präsynaptische Membran erreicht, kann es dort zur Freisetzung des Neurotransmitters aus der Zelle in den extrazellulären synaptischen Spalt kommen. Der Neurotransmitter kann an Neurotransmitter-Rezeptoren der postsynaptischen Membran binden. Der postsynaptische Teil der chemischen Synapse ist in vielen Fällen auf einer Ausstülpung des dendritischen Schafts gelegen, die als dendritischer Dorn bezeichnet wird. Die Bindung des Transmitters an die Rezeptoren der postsynaptischen Membran kann unterschiedliche Wirkungen haben. Es kann direkt oder auch indirekt, über eine Signalkaskade, zur Öffnung von Ionenkanälen in der postsynaptischen Membran kommen, was eine Veränderung der Ionenkonzentrationen in der Zelle und somit eine Depolarisation oder Hyperpolarisation bewirkt. Diese Veränderung der Potentialdifferenz breitet sich passiv bis zum Axonhügel aus, an welchem alle eintreffenden De- oder Hyperpolarisationen räumlich und zeitlich integriert werden. Bei Überschreitung



**Abbildung 1-3. Schematische Darstellung eines Neurons (Pyramidenzelle des Hippocampus) mit Zellkörper, Dendriten und Axon. Modifiziert nach Kandel, 2000.**

eines bestimmten Schwellenwerts wird ein neues Aktionspotential generiert, welches sich entlang des Axons ausbreitet und wiederum über Synapsen auf die Entstehung von Aktionspotentialen nachfolgender Neurone einwirkt. Eine durch Rezeptorbindung ausgelöste Signalkaskade kann zusätzliche Effekte auf das Neuron haben (Kandel *et al.* 2000).

Die Effizienz der Signalübertragung der chemischen Synapse ist sowohl auf der prä- als auch auf der postsynaptischen Seite regulierbar. Diese Modulationsmöglichkeit wird als synaptische Plastizität bezeichnet und bildet eine wesentliche Grundlage für Lernprozesse (Abbott & Nelson 2000). Auf der postsynaptischen Seite erfolgen die hierfür stattfindenden molekularen Veränderungen häufig im Bereich des dendritischen Dorns, genauer in einem Proteinnetzwerk, welches als postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet wird (Mulholland & Chandler 2007). Die verschiedenen dendritischen Dornen eines Neurons können dabei individuell reguliert werden (Harris & Kater 1994, Nimchinsky *et al.* 2002).

### 1.3 DIE POSTSYNAPTISCHE DICHTe

Als in den 1950er Jahren die Struktur der Synapse mit dem Elektronenmikroskop untersucht wurde, fand man eine elektronenundurchlässige Region unterhalb der postsynaptischen Membran (Palay & Palade 1955). Dadurch wurde die Bezeichnung dieser Region als postsynaptische Dichte geprägt (Akert *et al.* 1969). Die PSD ist ein Netzwerk aus mehreren hundert unterschiedlichen Proteinen, zu welchen Zelladhäsionsmoleküle, Proteine des Zytoskeletts, Gerüst- und Adapterproteine, membrangebundene Rezeptoren und Kanäle, G-Proteine und Modulatoren sowie Signalmoleküle zählen (Klauck & Scott 1995, Ziff 1997, Kennedy 2000, Husi *et al.* 2000, Sheng 2001, Collins *et al.* 2006). Durch die Komponenten der PSD werden zum einen die Neurotransmitter-Rezeptoren arrangiert und verankert, und zum anderen wird das vom präsynaptischen Neuron kommende Signal durch Signalkaskaden weitergetragen. Den Gerüstproteinen kommt dabei eine wichtige Stellung zu, da sie die Verbindung zwischen den in der Membran befindlichen Rezeptoren und dem Zytoskelett sowie den zytosolischen Molekülen nachgeschalteter Signalwege herstellen und damit eine effektive Signalweiterleitung und auch eine Verschaltung verschiedener Signalwege untereinander ermöglichen (Kornau *et al.* 1995, Sprengel *et al.* 1998). Zu den Gerüstproteinen zählen PSD-95, Homer, die SAPAP- und die Shank-Proteine. Eine Auswahl der vielfältigen Interaktionen der Gerüstproteine wird in Abbildung 1-4 veranschaulicht. Als wichtigste Gerüstbausteine



al. 1999), mehreren Aktin-regulierenden Molekülen (Du *et al.* 1998, Soltau *et al.* 2002, Park *et al.* 2003, Qualmann *et al.* 2004) und über das Protein Homer mit Glutamatrezeptoren (Tu *et al.* 1999). Bereits bei der Synapsenbildung spielen Shank-Proteine eine wichtige Rolle (Boeckers *et al.* 1999a, Sala *et al.* 2001).

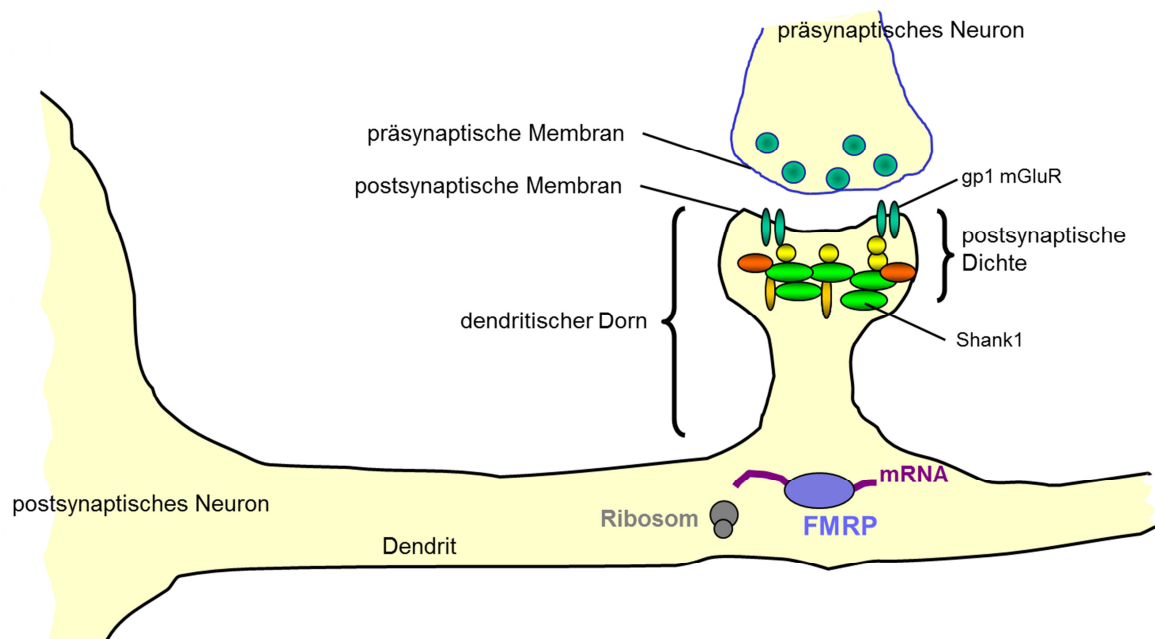
Die für die synaptische Plastizität notwendige Modulation der synaptischen Übertragungseffizienz erfolgt auf der postsynaptischen Seite in erster Linie über Veränderungen der PSD (Mulholland & Chandler 2007). Dabei kann eine Veränderung der Proteinkonzentration der Gerüstproteine aufgrund ihrer breiten Vernetzung (Abbildung 1-4) zu einer veränderten Effizienz der Synapse führen. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Gerüstproteine PSD-95, Homer und Shank1 jeweils die Größe der dendritischen Dornen und die Effizienz der Synapse erhöht (El-Husseini *et al.* 2000, Sala *et al.* 2001). Dagegen kommt es beim Fehlen von Shank1 zu kleineren dendritischen Dornen und zu einer schwächeren synaptischen Übertragung (Hung *et al.* 2008). In vivo kann die postsynaptische Konzentration von Shank1 über eine lokal am dendritischen Dorn stattfindende Translation der mRNA reguliert werden (Falley *et al.* 2009). Die zuvor genannten Ergebnisse zeigen, wie wichtig eine korrekte Regulation der PSD-Gerüstproteine und speziell Shank1 für eine fehlerfreie Funktion der Synapsen ist.

## 1.4 DIE MGLUR-THEORIE

Die derzeit gängige Theorie zu den molekularen Ursachen von FXS basiert auf der Tatsache, dass in Neuronen FMRP-defizienter Mäuse eine verstärkte *long term depression* (LTD) festgestellt wurde (Huber *et al.* 2002). LTD ist zusammen mit der *long term potentiation* (LTP) ein Mechanismus, mit dem die Effizienz einer Synapse modifiziert und somit die synaptische Plastizität ermöglicht wird. LTP führt dabei zu einer Stärkung von synaptischen Verbindungen, LTD hingegen bewirkt eine Schwächung oder Eliminierung. Beide Mechanismen sind das ganze Leben hindurch aktiv und notwendig für Lernprozesse und Gedächtnis (Bear & Malenka 1994). LTD kann durch die Aktivierung der metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe 1 (gp1 mGluR) initiiert werden, wobei mittels einer Signalkaskade eine Synthese neuer Proteine lokal am dendritischen Dorn über die Translation dort vorhandener mRNA-Moleküle erfolgt (Kemp & Bashir 1999, Huber *et al.* 2000). Bei FMRP-Defizienz kommt es hierbei nun zu einer erhöhten Proteinbiosyntheserate und somit einer stärker ausgeprägten



LTD (Huber *et al.* 2002). FMRP befindet sich an der Basis der dendritischen Dornen und wirkt dort über die Bindung von mRNA-Molekülen offenbar als Translationsrepressor (Abbildung 1-5) (Feng *et al.* 1997b). Dabei wird FMRP im Rahmen der LTD auch selbst neu synthetisiert und bremst dann die weitere Proteinbiosynthese (Huber *et al.* 2001). Die bei FXS beobachteten Symptome können auf den Überschuss von Proteinen nach Aktivierung der gp1 mGluR zurückzuführen sein. In der Tat führt eine verminderte Aktivierbarkeit der gp1 mGluR im Mausmodell zu einer Kompensation von FXS-Symptomen (McBride *et al.* 2005, Chuang *et al.* 2005, Yan *et al.* 2005, Tucker *et al.* 2006, Dölen *et al.* 2007). Zu den Proteinen, welche bei FMRP-Defizienz verstärkt synthetisiert werden und deren mRNA mit FMRP interagiert, zählt auch das PSD-Gerüstprotein Shank1 (Schütt *et al.* 2009, Darnell *et al.* 2011). Da Shank1 mit vielen PSD-Proteine interagiert, könnte sich eine Veränderung seiner Konzentration auf die Funktion der ganzen PSD und somit der synaptischen Übertragung auswirken. Eine Erhöhung der Shank1-Konzentration könnte eine maßgebliche Ursache der Symptome des Fragilen X-Syndroms sein. Falls dem so wäre, ist ein therapeutischer Eingriff



**Abbildung 1-5.** Schematische Darstellung eines Dendriten mit dendritischem Dorn, postsynaptischer Dichte und mRNA-bindendem FMRP an der Basis des Dorns. Bei der mGluR-Theorie wird davon ausgegangen, dass FMRP die durch gp1 mGluR-Aktivierung initiierte Proteinsynthese reguliert und in Abwesenheit von FMRP ein Protein-Überschuss und somit verstärkte LTD vorliegt. Dies wirkt sich negativ auf die synaptische Funktion aus.

zur Normalisierung der Konzentration von aktivem Shank1 einem Eingriff an den metabotropen Glutamatrezeptoren vorzuziehen, da eine Modulation der Rezeptoren von weitreichenden Nebenwirkungen begleitet sein könnte. Wenn die Erhöhung der Shank1-Konzentration die Hauptursache für FXS darstellt, dann wäre ein Eingriff auf dieser Ebene ebenso effektiv und, da er direkter wäre, eventuell von weniger Nebenwirkungen begleitet.

## 1.5 ZIEL DER ARBEIT

Das Ziel dieser Arbeit ist die Einordnung der Rolle von Shank1 im Krankheitsbild des Fragilen X-Syndroms. In Abwesenheit von FMRP liegt Shank1 in einer erhöhten Konzentration in der PSD vor (Schütt *et al.* 2009). Shank1 ist ein wichtiges Gerüstprotein der postsynaptischen Dichte und bei Veränderung seiner zellulären Konzentration wurde eine Veränderung der synaptischen Effizienz beobachtet (Sala *et al.* 2001, Sala *et al.* 2005, Hung *et al.* 2008). Entsprechend könnte die beim FMRP-Verlust beobachtete Erhöhung der Shank1-Konzentration die Funktion der Synapse beeinträchtigen und zu den FXS-Symptomen beitragen. Um die Beteiligung von Shank1 an der Pathogenese des Fragilen X-Syndroms zu verifizieren, wurden *Fmr1*-Knockout-Mäuse generiert, die zusätzlich ein inaktives *Shank1*-Allel besitzen. Die durch die FMRP-Defizienz hervorgerufene Erhöhung der Shank1-Proteinkonzentration soll durch die Inaktivierung eines *Shank1*-Allels wiederum reduziert werden. Dadurch sollte eine annähernd normale Shank1-Konzentration erreicht werden. Eine Untersuchung dieser Mäuse soll zeigen, ob auf diese Weise eine Kompensierung der FXS-Symptome erreicht werden kann. Dabei ist eine Analyse der Dornendichte und -morphologie, der Krampfanfälligkeit und der Lern- bzw. Gedächtnisleistung von besonderem Interesse. Falls die erhöhte Shank1-Konzentration hauptverantwortlich für die FXS-Symptome ist, sollte durch eine Normalisierung der Shank1-Konzentration eine Kompensierung zentraler FXS-Symptome erreicht werden können und eine Reduktion von aktiv verfügbarem Shank1 könnte möglicherweise einen zukünftigen Therapieansatz für das Fragile X-Syndrom darstellen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIALIEN

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) oder Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) in höchstmöglicher Qualität und Reinheit bezogen; Ausnahmen sind angegeben.

#### 2.1.2 Labortiere

Tabelle 2-1: Verwendete Labortiere

Name	Quelle
<i>Mus musculus</i> C57-Black 6/J	Versuchstierhaltung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), bezogen von The Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) bzw. Charles River Laboratories International, Inc. (Wilmington, USA)
<i>Mus musculus</i> B6.129P2-Fmr1 <sup>tm1Cgr</sup> /J	Versuchstierhaltung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), erhalten von The Jackson Laboratories, Lagernummer 003025. Erstmalig beschrieben: Consortium 1994.
<i>Mus musculus</i> B6.129S4-Shank1 <sup>tm1Shng</sup> /J	Versuchstierhaltung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), erhalten von T. Boeckers (Ulm). Erstmalig beschrieben: Hung <i>et al.</i> 2009.

#### 2.1.3 Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind nachfolgend aufgelistet. Der Ursprungsorganismus des Antikörpers ist durch den jeweiligen Präfix angegeben (gp: Meerschweinchen, m: Maus, rb: Kaninchen, d: Esel, g: Ziege). Mit HRP gekennzeichnete sekundäre Antikörper sind kovalent mit dem Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt, welches die für die Detektion notwendige Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert.

**Tabelle 2-2: Übersicht über die für Western Blots verwendeten primären Antikörper**

Primärer Antikörper	Arbeitskonzentration Western Blot	Quelle
gpAnti-Shank1, <i>polyclonal</i>	1:2000	Hans-Jürgen Kreienkamp, Institut für Humangenetik, UKE; #203.2
rbAnti-Shank1, <i>polyclonal</i>	1:1000	Sigma-Aldrich, HPA032129
rbAnti- $\beta$ -Tubulin III, <i>polyclonal</i>	1:2000	Sigma-Aldrich, T2200

**Tabelle 2-3: Übersicht über die für Western Blots verwendeten sekundären Antikörper**

Sekundärer Antikörper	Arbeitskonzentration on Western Blot	Quelle
HRP-gAnti-rb IgG	1:10000	Dianova GmbH (Hamburg), #111-035-144
HRP-gAnti-m IgG	1:10000	Dianova #115-035-062
HRP-dAnti-gp IgG	1:10000	Dianova #706-035-148

### 2.1.4 Oligonukleotide

Die für PCR (*polymerase chain reaction*) verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) synthetisiert. Die lyophilisiert verschickten Oligonukleotide wurden in didestilliertem Wasser zu 100  $\mu$ M zur Lagerung und zu 10  $\mu$ M zur Verwendung bei einer PCR gelöst.

**Tabelle 2-4. Verwendete Oligonukleotide für Analysen von *Mus musculus*; Amplifikatgröße gilt bei Verwendung mit dem jeweils zuerst aufgelisteten Oligonukleotid.**

Name	Sequenz 5' zu 3'	Referenz	Amplifikatgröße
Fmr1s	GATCCATTCCCTTAATCCCAGCAC	Janin	
Fmr2as	GGATTAACAGATCGTAGACGCTC	Ölschläger-	274 bp
Neo1as	GCTTTACGGTATCGCCGCTCCC	Schütt	590 bp
SAfwd	CTGTAGTGTGTAGTGGTTTCGACCT	Hans-Hinrich	
Del-rev	GGCCAACCTTCACTACATTCTGTC	Hönck	239 bp
neo250rev	GCTACTTCCATTTGTCACGTC		430 bp
LA-rev	GGCCAACCTTCACTACATTCTGTC	Hans-Hinrich	
Del-fwd	GCACCGGCTAGCCAGTCAG	Hönck, Sabine	169 bp
neo1556-fwd	CCTGCTCTTTACTGAAGGCTCTTTA	L. Kramp	360 bp

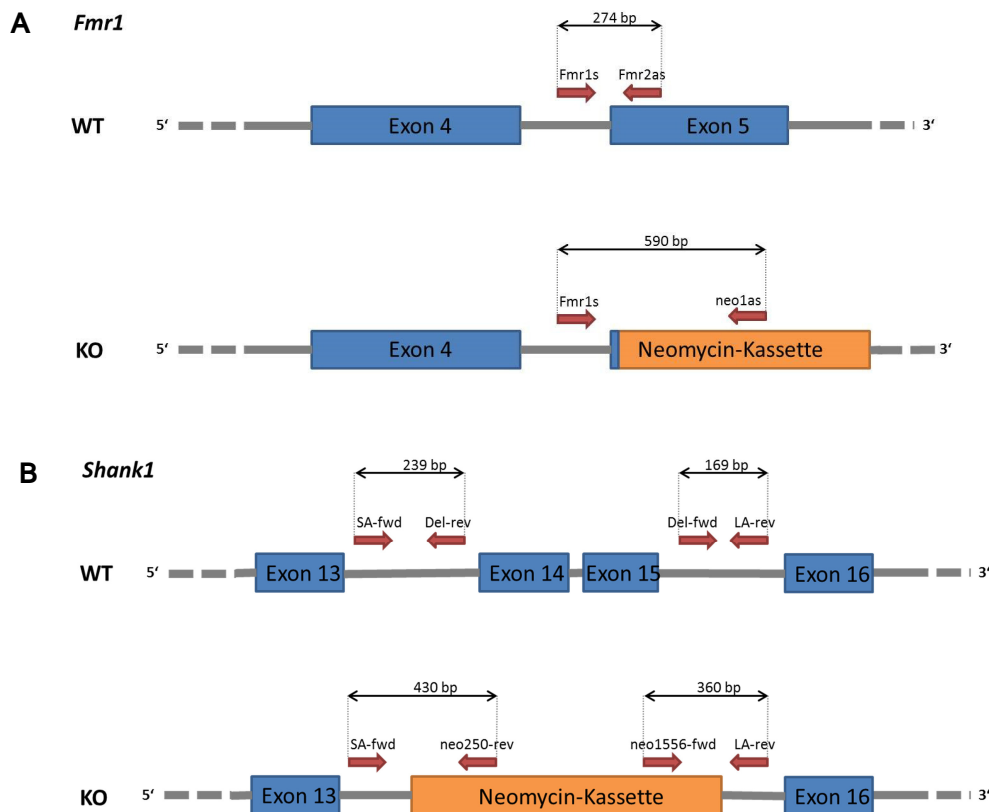


Abbildung 2-1. Schematische Darstellung von Teilen der Gene *Fmr1* und *Shank1* einer Wildtyp- bzw. Knockout-Maus. Die Lage der zur Genotypisierung verwendeten Oligonukleotide ist entsprechend ihrer Orientierung durch Pfeile veranschaulicht und die sich aus einem Oligonukleotid-Paar ergebende Amplifikatgröße ist angegeben. [A]: Ausschnitt des Gens *Fmr1* in der Wildtyp- und der *Fmr1*-Knockout-Situation. [B]: Ausschnitt des Gens *Shank1* in der Wildtyp- und der *Shank1*-Knockout-Situation.

## 2.2 ZUCHT DER VERSUCHSMÄUSE, KÖRPER- UND TESTESGEWICHT

Zur Erzeugung von Geschwistertieren mit den Genotypen *Fmr1*<sup>-/-</sup> *Shank1*<sup>+/+</sup> und *Fmr1*<sup>-/-</sup> *Shank1*<sup>+/-</sup> wurden mehrere Weibchen des Genotyps *Fmr1*<sup>-/-</sup> *Shank1*<sup>+/+</sup> aus der Linie B6.129P2-*Fmr1*<sup>tm1Cgr/J</sup> (im weiteren Text als B6.129P2-Linie, *Fmr1*-Knockout-Linie oder FB-Linie bezeichnet) mit mehreren Männchen des Genotyps *Fmr1*<sup>+/-</sup> *Shank1*<sup>+/-</sup> aus der Linie B6.129S4-*Shank1*<sup>tm1Shng/J</sup> (im weiteren Text als *Shank1*-Knockout-Linie bezeichnet) verpaart. Die nachfolgende Tabelle 2-5 gibt eine Übersicht über die hier verwendeten Genotypen.

Das Körpergewicht männlicher Mäuse wurde durch die Versuchstierhaltung des UKE am 30. Lebensstag bestimmt. Das Testesgewicht wurde durch Präparation und Wiegen der Hoden von 12 Wochen alten Mausböcken ermittelt.

Tabelle 2-5. Übersicht über die verwendeten Genotypen der Versuchsmäuse und ihre Abkürzungen.

Genotyp	Linie	Abkürzung
<i>Fmr1</i> <sup>+/-</sup> <i>Shank1</i> <sup>+/+</sup>	C57-Black 6/J	WT
<i>Fmr1</i> <sup>+/-</sup> <i>Shank1</i> <sup>+/-</sup> bzw. <i>Fmr1</i> <sup>+/+</sup> <i>Shank1</i> <sup>+/-</sup>	B6.129P2- <i>Fmr1</i> <sup>tm1Cgr</sup> /J	FB
<i>Fmr1</i> <sup>-/-</sup> <i>Shank1</i> <sup>+/+</sup>	B6.129S4- <i>Shank1</i> <sup>tm1Shng</sup> /J	S
<i>Fmr1</i> <sup>-/-</sup> <i>Shank1</i> <sup>+/+</sup>	Verpaarung FB x S	F
<i>Fmr1</i> <sup>-/-</sup> <i>Shank1</i> <sup>+/-</sup>	Verpaarung FB x S	FS

## 2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.3.1 Präparation genomischer DNA

Aus Schwanzbiopsien von Mäusen wurde mit Hilfe der *DirectPCR-Tail*-Lösung (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen) und 0,2 mg/ml Proteinase K nach Herstellerangaben ein Gewebelysat erhalten. Das Gewebelysat enthält genomische DNA und wurde nachfolgend in Genotypisierungs-PCR eingesetzt.

### 2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR zur Genotypisierung von Mäusen wurden mit den zuvor aufgelisteten Oligonukleotiden und mit der Taq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden) und dem dazugehörigen Probenpuffer durchgeführt. Der Reaktionsansatz je Probe und die PCR-Bedingungen sind in nachfolgenden Tabellen zusammengefasst und die PCR wurden mit dem GeneAmp PCR System 2400 oder 9700 Thermocycler (PerkinElmer, Waltham, USA) durchgeführt.

Tabelle 2-6. Reaktionsansatz für Genotypisierungs-PCR

Reagenzien	Volumen [ $\mu$ l]
10x Puffer	2
Magnesiumchlorid, 25 mM	1,2
dNTP, 10 mM	1
Fmr1s bzw. SAfwd, 10 $\mu$ M	1
Fmr2as bzw. LArev, 10 $\mu$ M	1
neo1as bzw. neo250rev, 10 $\mu$ M	1
H <sub>2</sub> O	11,6
Taq DNA Polymerase	0,2
Gewebelysat	2

Tabelle 2-7. Bedingungen der Genotypisierungs-PCR

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94	5 Minuten	–
Denaturierung	94	30 Sekunden	} 35 Zyklen
Oligonukleotid-Anlagerung	58	30 Sekunden	
Verlängerung	72	1 Minute	
Terminale Verlängerung	72	7 Minuten	–
Lagerung	4	∞	–

### 2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung der bei der Genotypisierungs-PCR erzeugten Amplifikate wurden 1%ige Agarosegele für eine horizontale nicht denaturierende Elektrophorese nach Sambrook et al. 1989 verwendet. Als Größenmarker wurde der 100 bp-Marker von Invitrogen, Life Technologies GmbH (Darmstadt) eingesetzt und die Detektion erfolgte mittels UV-Licht.

## 2.4 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

### 2.4.1 PSD-Präparation

Es wurde je PSD-Präparation 3-4 Mäusen das Gehirn entnommen und die PSD aus dem Vorderhirn (Cortex und Hippocampus) nach Carlin *et al.* (1980) biochemisch isoliert.

### 2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über einen Bradford-Assay (Bradford-Reagenz; Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA). Als Vergleich diente eine BSA-Standardreihe von 1 µg/µl bis 10 µg/µl. 1 µl der Probe wurde mit 19 µl Wasser versetzt eingesetzt und wie die Standardreihe mit 180 µl Bradford-Reagenzmischung versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubation erfolgte die Extinktionsmessung bei 620 nm im Absorptions-Messgerät Tristar LB 941 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad) und die Auswertung anhand der Standardkurve im Programm Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

### 2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE wurde mit 8%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen (Sambrook *et al.* 1989) zur Proteinauftrennung nach der von Lämmli etablierten Methode durchgeführt (Laemmli 1970). Für die Elektrophorese wurde das Mini-PROTEAN Tetra Cell-System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) eingesetzt. Die jeweiligen Proteinproben wurden mit 5-fachem Lämmli-puffer versetzt, die Proteine wurden bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert und anschließend bei 200 V in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris pH 8,0; 0,1 % SDS (v/v); 192 mM Glycin; pH 8,3) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard diente ein vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker (PageRuler Plus *Prestained Protein Ladder*; Thermo Scientific).

### 2.4.4 Western Blot-Analysen

Zur Visualisierung von Proteinen mittels Immunodetektion wurden diese nach der Auftrennung durch SDS-PAGE elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (Protran; Whatman, GE Healthcare Europe GmbH, München) übertragen. Der Transfer erfolgte mit dem *tank* Verfahren nach Angaben der Hersteller von Membran und Blot-Apparatur (Mini Trans-Blot Cell, Bio-rad) in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20 % Methanol (v/v), 0,02 % SDS (v/v); pH 8,0) für 75 Minuten bei 100 V unter Eiskühlung. Nach einer erfolgreichen Proteinübertragung wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierlösung (5 % Magermilchpulver in PBS-T; PBS (Sambrook *et al.*, 1989); PBS-T: PBS + 0,2 % Tween-20 (v/v)) inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Die Reaktion mit dem primären Antikörper, der in entsprechender Arbeitskonzentration eingesetzt wurde (Tabelle 2-2), erfolgte über Nacht bei 4 °C oder für 1-3 Stunden bei Raumtemperatur. Nach drei 10-minütigen Waschschritten mit PBS-T folgte die Inkubation mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären Antikörper in entsprechender Arbeitskonzentration (Tabelle 2-3) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss an sechs weitere 10-minütige Waschschrritte in PBS-T wurden die antikörpermarkierten Proteine mit Hilfe des ECL-Systems (SuperSignal West Pico; Thermo Scientific) nach Herstellerangaben auf Röntgenfilmen (Cronex 5 Medical X-Ray Film; Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien) oder mit dem ChemiDoc XRS-System (Bio-rad) detektiert. Die densitometrische Auswertung der detektierten Signale erfolgte bei Röntgenfilmen mit dem Programm ImageJ (NIH, Bethesda, USA) und bei Verwendung des ChemiDoc XRS-System mit dem zugehörigen Programm Quantity One.



## 2.5 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.5.1 Präparation und Kultivierung primärer Cortexneurone

Cortexneurone wurden aus 18 Tage alten Mausembryonen präpariert. Dabei wurden die präparierten Cortex-Hälften (ohne Hirnhäute) in 1x HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*, Gibco, Life Technologies), versetzt mit 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin, gesammelt. Alle folgenden Angaben gelten für 6 Gehirne, also 12 Cortices. Die Cortex-Hälften wurden zerkleinert und 30 Minuten mit 0,25 % Trypsin in 25 ml HBSS bei 37 °C inkubiert. Danach wurde dreimal fünf Minuten mit je 50 ml Plattiermedium (*Modified Eagle Medium (MEM)*, Gibco; 10 % Pferdeserum (v/v), Gibco) gewaschen, und das Gewebe dann in 12 ml Medium mit der 10 ml-Pipette grob zerkleinert und anschließend in 4 ml-Aliquots titriert. Die Suspension wurde anschließend durch eine Nylongaze gefiltert (*Cellstrainer*, 40 µm, Falcon) und die Zellzahl bestimmt. Es wurden  $6 \times 10^6$  Neurone in 2 ml Plattiermedium in jede Vertiefung einer Poly-L-Lysin beschichteten 6-well-Platte gegeben. Nach dem Absetzen der Neurone (3-4 Stunden) wurde das Plattiermedium gegen Neurobasal-Medium (*Neurobasal Medium*, Gibco; 1x B27 Supplement, Gibco; 0,5 mM L-Glutamin, Gibco; 25 µM Glutamat, Sigma; 100 µg/µl Primocin, Invivogen, San Diego, USA) ausgetauscht.

### 2.5.2 Gewinnung von Proteinlysaten aus kultivierten Neuronen

Nach einer achttägigen Kultivierung wurde ein Proteinlysate der Neurone gewonnen. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl RIPA (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 % NP40; 0,5 % Natriumdeoxychelat; 0,1 % SDS; 5 mM EDTA; pH 7,4) versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden noch haftende Neurone abgeschabt und die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Eine 10-minütige Zentrifugation bei 16000 g erlaubt die Abtrennung von Zellkernen und der Überstand wurde zur Analyse im Western-Blot eingesetzt.

## 2.6 HISTOLOGISCHE METHODEN

### 2.6.1 Golgi-Cox-Färbung

Zur Färbung von Neuronen nach der Golgi-Cox-Methode wurde das Gehirn einer vier (juvenil) oder zwölf (adult) Wochen alten männlichen Maus entnommen und in die Golgi-Cox-Lösung (1 % Kaliumdichromat; 1 % Quecksilberchlorid; 0,8 % Kaliumchromat) gegeben. Nach einer 14-18-tägigen Inkubation im Dunkeln wird das Gehirn dann dreimal für 2 Minuten mit Wasser gewaschen. Es folgt eine Ethanolreihe, die mit einer vierstündigen Inkubation des Gehirns in einer 50%igen Ethanollösung beginnt und mit jeweils 24-stündigen Inkubationen von Ethanollösungen aufsteigenden Ethanolgehalts (70 %, 80 %, 100 %) fortgesetzt wird. Zum Abschluss wird noch eine zweite 24-stündige Inkubation mit einer 100%igen Ethanollösung durchgeführt. Am Vibratom (Vibratome VT1000 S; Leica Biosysteme GmbH, Nussloch) werden 200 µm dünne Schnitte des Gehirns angefertigt und in PBS aufgenommen. Einer 40-minütigen Inkubation der Gehirnschnitte in 16%iger Ammoniaklösung folgt ein 10-minütiger Waschschriff mit Wasser. Daran schließt sich eine 10-minütige Inkubation mit 1%iger Natriumthiosulfatlösung an, worauf zwei weitere 10-minütige Waschschriffe mit Wasser und schließlich eine aufsteigende Ethanolreihe (50 %, 70 %, 80 %, 100 %, 100 %; für jeweils 10 Minuten) durchgeführt wird. Einer 10-minütigen Inkubation mit einer Isopropanol/Ethanol-Lösung (1:1) folgt eine 15-minütige Inkubation mit Xylol. Hiernach werden die Schnitte mit Entellan (Merck) auf Objektträger gebracht und mit Deckgläschen abgedeckt. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Janin Ölschläger-Schütt durchgeführt.

### 2.6.2 Mikroskopische Analyse dendritischer Dornen

Von den nach der Golgi-Cox-Methode gefärbten Gehirnschnitten wurden mit einem Durchlichtmikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) unter Verwendung verschiedener Objektive (5x, 10x, 20x, 40x, 63x) Fotos verschiedener Vergrößerungen gemacht. Dazu wurde das Programm Kappa Control (Kappa optronics GmbH, Gleichen) verwendet. Je Maus wurden von unterschiedlichen Gehirnschnitten insgesamt 8-12 Neurone aus Schicht 2/3 des visuellen Cortex fotografiert. Bei Verwendung des 63x-Objektivs wurden dabei je Bildausschnitt 5-15 Bilder mit jeweils leicht unterschiedlicher Fokussierung gespeichert, sodass nach

Möglichkeit alle Strukturen des dreidimensionalen Dendriten scharf erfasst werden. Mit Hilfe des Programms ImageJ wurde jeweils der apikale Dendrit in einer Entfernung von 50-150  $\mu\text{m}$  (proximal) und 150-250  $\mu\text{m}$  (distal) vom Soma analysiert. In den fotografierten Abschnitten wurde unter Beachtung aller Fokussierungsebenen die Dornendichte bestimmt sowie die Länge und die Breite (an der breitesten Stelle) der einzelnen dendritischen Dornen. Hierbei wurden achtzehn der untersuchten Gehirne von mir selbst und sechs von Dr. Janin Ölschläger-Schütt fotografiert und ausgemessen. Anschließend wurde mit dem Programm Excel der Quotient aus Länge und Breite für jeden einzelnen Dorn berechnet.

## 2.7 VERHALTENSBIOLOGISCHE METHODEN

Für verhaltensbiologische Analysen wurden 10-20 Wochen alte männliche Mäuse eingesetzt. Pro Käfig wurden je 2-4 Geschwistertiere gemeinsam gehalten und vor Beginn der Untersuchungen befanden sie sich seit 14 Tagen in der Mausbarriere der Untersuchungsanlage mit einem inversen Tag-Nacht-Zyklus (7-19 Uhr: Dunkelheit; 19-7 Uhr: Licht). Da Mäuse nachtaktiv sind, ermöglicht der inverse Tag-Nacht-Zyklus tagsüber eine Untersuchung der Mäuse in ihrer aktiven Phase. Währenddessen wurde zudem zur Gewöhnung für die Maus viermal das Herausnehmen aus dem Käfig und die allgemeine Handhabung geübt. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Janin Ölschläger-Schütt und entweder in der Reihenfolge *Open Field*, *Elevated Plus Maze*, *Y-Maze*, *Social Interaction*, *Fear Conditioning* oder *Open Field*, *Inhibitory Avoidance Extinction* durchgeführt. Die Tests wurden jeweils in einem Abstand von mindestens zwei Tagen durchgeführt. Die gesamte Versuchsdauer betrug ca. 17 Wochen.

### 2.7.1 *Open Field*

Der *Open Field*-Versuch erlaubt die Untersuchung der allgemeinen Aktivität und der Ängstlichkeit von Nagetieren. Das Versuchsareal besteht aus einer hölzernen, weiß laminierten Box (50 x 50 cm, 40 cm hohe Wände). Unter heller Beleuchtung wurden die Mäuse einzeln in die Mitte des Versuchsareals gesetzt und konnten sich anschließend für 15 Minuten frei bewegen. Über das Videokamerasystem Viewer II (Biobserve GmbH, St. Augustin) wurde der Körpermittelpunkt der Maus erfasst und die zurückgelegte Strecke und die Aufenthaltsdauer im Zentrum des Versuchsareals (eine imaginäre Fläche von 20 x 20 cm in der Mitte des Areal) dokumentiert.

### **2.7.2 Elevated Plus Maze**

Das *Elevated Plus Maze* ist ein klassischer Versuch zur Untersuchung der Ängstlichkeit bei Nagetieren, der darauf beruht, dass sich Mäuse im Schutz einer Wand sicherer fühlen als im freien Raum. Der Versuch wird in einem Plus-förmigen Versuchsareal durchgeführt, wobei die vier Arme jeweils eine Länge von 30 cm mit einer Breite von 5 cm haben. Das Zentrum umfasst somit einen Bereich von 5 x 5 cm. Zwei gegenüberliegende Arme sind mit drei ca. 15 cm hohen Wänden versehen (geschlossene Arme), während die anderen beiden Arme lediglich eine minimal erhöhte Abschlusskante haben (offene Arme); zum Zentrum hin sind alle Arme offen. Die letzten ca. 5,5 cm der offenen Arme werden als sogenannter Randbereich bezeichnet. Unter für Mäuse nicht wahrnehmbarer roter Beleuchtung wird je eine Maus in das Zentrum gesetzt und darf sich für 5 Minuten frei bewegen. Während dieser Zeit wird das Laufverhalten der Maus mit dem Videosystem Viewer II (Biobserve) erfasst und die Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Arme sowie die zurückgelegte Strecke und die Aufenthaltsdauer in den Bereichen ausgewertet. Ein Eintritt in einen Arm erfolgt bei Überschreiten einer imaginären Grenzlinie mit dem Körpermittelpunkt.

### **2.7.3 Y-Maze**

Der *Y-Maze*-Test ist ein klassischer Versuch zur Untersuchung des Arbeitsgedächtnisses bei Nagetieren, da sie die Erkundung von unbekanntem bzw. lange nicht besuchten Orten den bereits bekannten bzw. gerade besuchten vorziehen. Das Versuchsareal hat eine Ypsilon-förmige Grundfläche, mit drei Armen von je 30 cm Länge, 8 cm Breite und 15 cm hohen Wänden. Dadurch entsteht ein dreieckiges Zentrum, in welches die Maus zu Beginn des Versuches gesetzt wird. Unter schwacher Beleuchtung darf sie sich anschließend frei bewegen. Die Eintritte in die Arme werden dokumentiert; als Eintritt gilt dabei der Übertritt mit allen vier Pfoten über die imaginäre Grenzlinie. Der Versuch wird beendet, wenn die Maus 26 Eintritte absolviert hat.

### **2.7.4 Social Interaction**

Der *Social Interaction*-Test erlaubt die Untersuchung des Sozialverhaltens und des räumlichen Lernens. Das Versuchsareal ist quadratisch (50 x 50 cm, 40 cm hohe Wände) und wird durch

eine Trennwand halbiert. Eine Öffnung in der Trennwand erlaubt den freien Durchgang zu beiden Bereichen. Spiegelsymmetrisch zueinander befindet sich jeweils ein perforiertes Becherglas in einer äußeren Ecke beider Bereiche. In einem Becherglas befindet sich ein geschlechtsreifes Weibchen, das andere Becherglas ist leer. Unter heller Beleuchtung wird nun ein Männchen so in das Versuchsareal gesetzt, dass es mit der Nase nur einige Zentimeter vom Weibchen-Becherglas entfernt ist. Auf diese Weise bemerkt das Männchen gleich zu Beginn die Anwesenheit des Weibchens und anschließend kann sich das Männchen für 20 Minuten frei bewegen. Das Laufverhalten des Männchens wird über das Videosystem Vierer II (Bioobserve) aufgezeichnet und es wird die insgesamt zurückgelegte Strecke sowie die im Umkreis von ca. 6 cm um das Becherglas des Weibchens und das leere Becherglas verbrachte Zeit analysiert. Einen Tag später wird das Männchen erneut in dasselbe Versuchsareal gesetzt, mit dem Unterschied, dass nun beide Bechergläser leer sind. Erneut darf sich das Männchen für 20 Minuten frei bewegen und die zuvor genannten Parameter werden wiederum analysiert. Die bei diesem Versuch verwendeten Weibchen werden zur Vermeidung von Stress höchstens zweimal am Tag eingesetzt.

### **2.7.5 Fear Conditioning**

Beim *Fear Conditioning* können die Gedächtnis- bzw. Lernleistung untersucht werden, indem das Versuchstier den Zusammenhang zwischen einer Umgebung und einem Stromschlag lernen und erinnern soll. Dazu wird die Maus in ein rechteckiges Versuchsareal (22 x 28 cm, 15 cm hohe Wände) gesetzt, welches Bestandteil des TSE Multiconditioning System (TSE Systems GmbH, Bad Homburg) ist. Der Boden besteht aus einem Metallgitter und hierüber erfährt die Maus nach einer zweiminütigen Habituationszeit drei Stromschläge (0,3 mA, 2 Sekunden zum Zeitpunkt 2:00, 2:40, 3:20). Zwanzig Sekunden nach dem letzten Stromschlag wird die Maus wieder in ihren Heimkäfig gesetzt. Während der gesamten Zeit wird durch das zugehörige Computerprogramm das sogenannte *Freezing*, das Verharren in Bewegungslosigkeit, zeitlich erfasst. Einen Tag danach wird die Maus erneut in dasselbe Versuchsareal gesetzt und über eine Dauer von 30 Minuten wird die Zeit erfasst, die die Maus in Bewegungslosigkeit verharret. Einen weiteren Tag danach wird die Maus für 4 Minuten in das Versuchsareal gesetzt und das *Freezing* gemessen. Das Verharren in Bewegungslosigkeit ist eine Angstreaktion bei Nagetieren. Über den Ausdruck von Angst kann man Rückschlüsse da-

rauf ziehen, ob das Tier die Umgebung mit der negativen Erfahrung des Stromschlages assoziiert. Ein Tier, welches zu Lern- und Gedächtnisleistung fähig ist, wird am zweiten Tag deutlich mehr Zeit in Bewegungslosigkeit verbringen als während der Habituationsphase des ersten Tages. Da im Verlauf des 30-minütigen Aufenthalts im Versuchsareal an Tag 2 kein Stromschlag erfolgt, erwartet man an Tag 3 eine geringere Dauer von in Bewegungslosigkeit verbrachter Zeit. Hierdurch kann das Extinktionsvermögen beurteilt werden.

### **2.7.6 Inhibitory Avoidance Extinction**

In Ergänzung zum *Fear Conditioning* erlaubt auch der *Inhibitory Avoidance Extinction*-Versuch eine Beurteilung der Gedächtnis- bzw. Lernleistung sowie des Extinktionsvermögens. Das Versuchsareal ist Bestandteil des TSE Multiconditioning System (TSE Systems) und besteht aus einem hell erleuchteten quadratischen Areal (13 x 13 cm, 15 cm hohe Wände), welches durch eine elektrisch bedienbare Tür mit einem dunklen Areal (22 x 28 cm, 15 cm hohe Wände) verbunden werden kann. Der Boden besteht jeweils aus einem Metallgitter. Der Versuch basiert auf der Tatsache, dass Mäuse als nachtaktive Tiere dunkle Bereiche einer hell erleuchteten Umgebung vorziehen. Zu Beginn des Versuches wird die Maus in das helle Kompartiment gesetzt und nach 20 Sekunden öffnet sich die Tür zum dunklen Bereich. Es wird nun über das zugehörige Computerprogramm die Zeit gemessen, die bis zum Übertritt der Maus in das dunkle Kompartiment vergeht (Latenzzeit). Im dunklen Kompartiment erhält die Maus eine Sekunde nach dem Betreten einen Stromschlag (0,5 mA, 2 Sekunden) über das Metallgitter am Boden. Zwanzig Sekunden danach wird die Maus wieder in ihren Heimkäfig gesetzt. Sechs, 24 und 48 Stunden später wird dieselbe Maus wieder in das helle Kompartiment gesetzt und die Latenzzeit wird erneut gemessen. Jetzt erhält die Maus nach Übertritt in das dunkle Kompartiment keinen Stromschlag, sondern darf es für 90 Sekunden erkunden. Dadurch findet eine Extinktion des zuvor Gelernten statt und während die Latenzzeit nach 6 Stunden sehr hoch ist, verkürzt sie sich im weiteren Versuchsverlauf. Eine Maus, welche nach 10 Minuten noch nicht in das dunkle Kompartiment übergetreten ist, wird mit einer Karte vorsichtig hinübergeleitet, um ihr die Gelegenheit zu geben, das dunkle Kompartiment für 90 Sekunden zu erkunden.

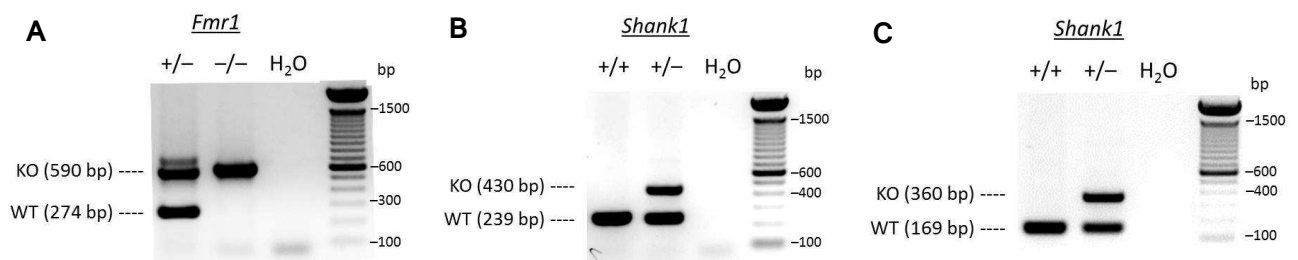
## 2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung der Proteinquantifizierungen in PSD-Proben und Proteinlysaten kultivierter Neurone erfolgte in Absprache mit der statistischen Beratung des Instituts für medizinische Biometrik und Epidemiologie (UKE) mit einem hierarchisch strukturierten linearen gemischten Modell unter Verwendung der auf Tubulin normierten und logarithmierten Werte mit dem Programm SPSS (IBM Corporation, Armonk, USA). Dabei wird die Anzahl der unabhängigen Versuche und Western Blot-Experimente berücksichtigt. Die statistische Auswertung des Körpergewichtes, Testesgewichtes, Dornenlänge und -breite und daraus gebildeter Quotient, *Open Field*, *Elevated Plus Maze*, *Social Interaction* und *Fear Conditioning* erfolgte mit einer Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Programm SPSS. Die statistische Auswertung des *Y-Maze*-Versuchs erfolgte durch einen Einstichproben-T-Test mit dem Programm SPSS. Beim linearen gemischten Modell, ANOVA und T-Test wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  zugrunde gelegt. Die statistische Auswertung des *Inhibitory Avoidance Extinction*-Versuchs erfolgte durch die statistischen Beratung des Instituts für medizinische Biometrik und Epidemiologie (UKE) mit einem Überlebenszeitanalyse-Modell (Frailty-Modell) unter Verwendung des Programms SAS (SAS Institute Corporation, Cary, USA). Der Stichprobenumfang ist im jeweiligen Abschnitt des Ergebnisteils angegeben.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 GENOTYPISIERUNG DER VERSUCHSMÄUSE

Zur Genotypisierung der Versuchsmäuse wurde genomische DNA aus lysierten Schwanzbiopsien in einer PCR als Matrize eingesetzt. Bei der *Fmr1*-Genotypisierungs-PCR kommt es durch die Oligonukleotidpaare *Fmr1s* und *Fmr2as* bzw. *Fmr1s* und *neo1as* zur Synthese von 274 bp- bzw. 590 bp-Amplifikaten, die für das WT-Allel bzw. das mutierte *Fmr1*-Gen mit einer eingefügten Neomycin-Kassette charakteristisch sind (Abbildung 3-1, A). Bei der Analyse des *Shank1*-Genotyps kommt es durch die Oligonukleotidpaare SA-fwd und Del-rev zur Bildung eines charakteristischen 239 bp-langen PCR-Produkts, während die Oligonukleotidpaare SA-fwd und neo250-rev lediglich bei dem durch eine eingefügte Neomycin-Kassette veränderten *Shank1*-Gen zu einem 430 bp-langen Amplifikat führen (Abbildung 3-1, B). Zur Verifizierung erfolgte stets eine zusätzliche Bestimmung mit den Oligonukleotidpaaren LA-rev und Del-fwd bzw. LA-rev und neo1556-fwd. Dabei wird bei einem WT-Allel durch erstgenanntes Oligonukleotidpaar ein 360 bp-Amplifikat gebildet, während das mutierte *Shank1*-Gen mit dem zweiten Oligonukleotidpaar zu einem 169 bp-langen PCR-Produkt führt (Abbildung 3-1, C).



**Abbildung 3-1.** Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Amplifikaten der Genotypisierungs-PCR für die Gene *Fmr1* und *Shank1*. Es sind jeweils die PCR-Produkte zweier Proben genomischer DNA (mit Angabe des Genotyps) und einer Wasserkontrolle sowie zusätzlich als Größenmarker ein 100 bp-Marker dargestellt. [A] *Fmr1*-Genotypisierung. Es wird bei einem *Fmr1*-Wildtyp-Allel ein PCR-Produkt charakteristischer Größe (274 bp) synthetisiert, während das mutierte Gen zur Synthese eines größeren Amplifikats (590 bp) führt. [B] *Shank1*-Genotypisierung mit den Oligonukleotiden SA-fwd, Del-rev, neo250-rev. Auch hier führt ein *Shank1*-Wildtyp-Allel zu einem Amplifikat charakteristischer Größe (239 bp), das mutierte Gen führt hingegen zur Synthese eines größeren PCR-Produkts (430 bp). [C] *Shank1*-Genotypisierung mit den Oligonukleotiden LA-rev, Del-fwd, neo1556-fwd. Ein *Shank1*-Wildtyp-Allel führt zu einem 169 bp-Amplifikat das mutierte Gen führt hingegen zur Synthese eines 360 bp-PCR-Produkts.



### 3.2 ERZEUGUNG DER *FMR1-SHANK1*-MÄUSE

Durch die Verpaarung von FMRP-defizienten Weibchen mit heterozygoten *Shank1*-Knockout-Männchen entstehen die sogenannten *Fmr1-Shank1*-Mäuse (Abbildung 3-2). Die Geschlechterverteilung in der Nachkommenschaft ist ausgewogen und sowohl bei der Vererbung des *Fmr1*- als auch des *Shank1*-Genlokus zeigt sich die nach den klassischen Mendel'schen Regeln zu erwartende Allelfrequenz. Mit durchschnittlich 6 Jungtieren liegt eine normale Wurfgröße vor (The Jackson Laboratory, C57BL/6J Datenblatt).

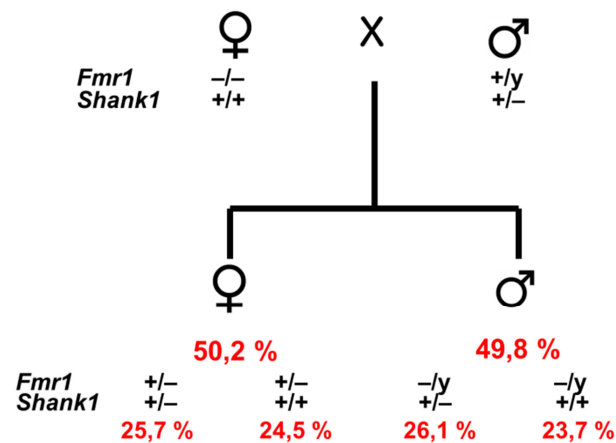


Abbildung 3-2. Zucht der *Fmr1-Shank1*-Mäuse. Analysiert wurden 654 Nachkommen aus 108 Würfen. Der prozentuale Anteil der Geschlechter und der vier möglichen Genotypen innerhalb der Nachkommenschaft ist zusätzlich angegeben und die beobachtete Verteilung entspricht der klassischen Genetik.

Für unsere Analysen wurden von mehreren Zuchtpärchen männliche Geschwistertiere mit dem Genotyp *Fmr1<sup>-ly</sup> Shank1<sup>+/+</sup>* (nachfolgend auch als F bezeichnet) und *Fmr1<sup>-ly</sup> Shank1<sup>+/-</sup>* (nachfolgend auch als FS bezeichnet) verwendet. Zusätzlich wurden bei einem Teil der Analysen *Fmr1<sup>-ly</sup> Shank1<sup>+/+</sup>*-Mäuse der Elternlinie B6.129P2 (nachfolgend auch als FB bzw. FB-Mäuse bezeichnet) und *Fmr1<sup>+ly</sup> Shank1<sup>+/-</sup>*-Mäuse aus der *Shank1*-Knockout-Linie (nachfolgend auch als S bezeichnet) verwendet. Wildtyp-Mäuse stammten aus der C57BL/6J-Mauslinie der Versuchstierhaltung des UKE (nachfolgend auch als WT bezeichnet).

### 3.3 VERIFIZIERUNG DER REDUKTION DER SHANK1-PROTEINKONZENTRATION

Da in FMRP-defizienten Mäusen eine signifikant erhöhte Shank1-Proteinkonzentration in der PSD gefunden wurde (Schütt *et al.* 2009), soll versucht werden, dies durch eine zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels zu kompensieren. Um zu untersuchen, ob dies tatsäch-

lich zu einer Normalisierung der Shank1-Proteinkonzentration führt, wurde aus dem Vorderhirn Mäusen eine PSD-Fraktion gewonnen und Shank1 mittels Western Blot nachgewiesen. Hierbei konnte durch 3 unabhängige Präparationen in der PSD-Fraktion der FS-Mäuse nach Abgleich auf Tubulin eine durchschnittliche Shank1-Proteinkonzentration von 84 % des Wildtyp-Niveaus gefunden werden. Somit konnte die bei FMRP-Defizienz gefundene Erhöhung der Shank1-Konzentration durch die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels kompensiert werden.

### 3.4 JUVENILES KÖRPERGEWICHT

Bei FMRP-defizienten Menschen und Mäusen wurde ein erhöhtes juveniles Körpergewicht festgestellt (McLennan *et al.* 2011, Raspa *et al.* 2010, Pacey *et al.* 2011, Dölen *et al.* 2007). Um diesen Phänotyp für unsere Mäuse zu überprüfen, wurden sie am 30. Lebenstag gewogen. Das dabei erzielte durchschnittliche Gewicht von Wildtyp-Mäusen beträgt 17,3 g. Sowohl die F-Mäuse mit 19,1 g, als auch die FB-Mäuse mit 19,9 g haben gegenüber den WT-Tieren ein signifikant erhöhtes durchschnittliches Körpergewicht (Abbildung 3-3). Auch bei der zusätzlich zur FMRP-Defizienz eingeführten Inaktivierung eines *Shank1*-Allels lässt sich mit durchschnittlich 19,6 g ein signifikant erhöhtes Körpergewicht beobachten, sodass dies keinen Ein-

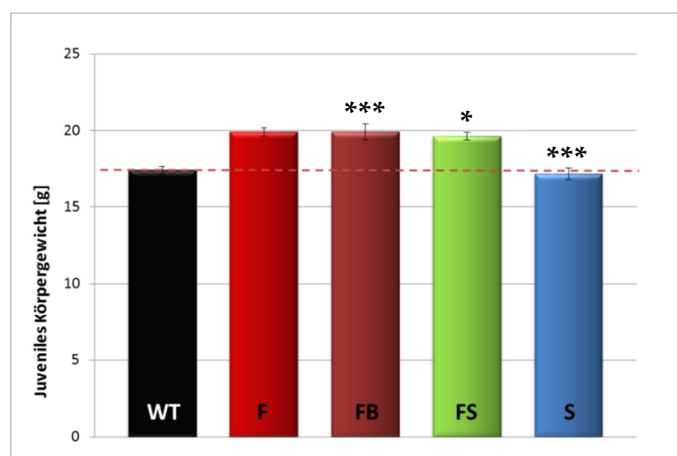


Abbildung 3-3. Juveniles Körpergewicht, Mittelwerte mit Standardfehler, n = 102 (WT), 106 (F), 13 (FB), 95 (FS), 56 (S). ANOVA, Vergleich zu WT: p = <0,000 (F); 0,024 (FB), <0,000 (FS); markiert durch Sternchen. Wildtyp-Niveau durch gestrichelte Linie gekennzeichnet. FMRP-Defizienz führt zu einer signifikanten Erhöhung des juvenilen Körpergewichtes gegenüber Wildtyp-Mäusen, wobei eine Inaktivierung eines *Shank1*-Allels keinen Einfluss hat.

fluss auf diesen Phänotyp zu haben scheint. Dies wird bestätigt durch die Mäuse mit der alleinigen Inaktivierung eines *Shank1*-Allels, deren durchschnittliches Gewicht mit 17,1 g dem der Wildtyp-Mäuse entspricht.

### 3.5 TESTESGEWICHT

Sowohl beim Fragilen X-Syndrom als auch bei FMRP-defizienten Mäusen wurde ein erhöhtes Testesgewicht festgestellt (Berkovitz *et al.* 1986, Consortium 1994). Um dies für unsere Mäuse zu verifizieren und um die von uns neu generierten FMRP-defizienten Mäuse mit der zusätzlichen Inaktivierung eines *Shank1*-Allels zu analysieren, habe ich die Hoden von adulten, 12 Wochen alten Mäusen präpariert und gewogen. Während das durchschnittliche Testesgewicht bei Wildtyp-Mäusen bei 0,194 g liegt, zeigt sich bei FMRP-defizienten Mäusen eine signifikante Erhöhung des Gewichts auf 0,245 g (F) bzw. 0,218 g (FB). Auch zwischen F und FB liegt ein signifikanter Unterschied im Testesgewicht vor. Weder die zusätzliche, noch die alleinige Ausschaltung eines *Shank1*-Allels beeinflusst das Testesgewicht: bei FS-Mäusen entspricht es mit 0,229 g etwa dem der F- und FB-Tiere und ist ebenfalls signifikant erhöht gegenüber den Wildtyp-Tieren; S-Mäuse haben mit 0,187 g ein den Wildtyp-Tieren entsprechendes Testesgewicht (Abbildung 3-4).

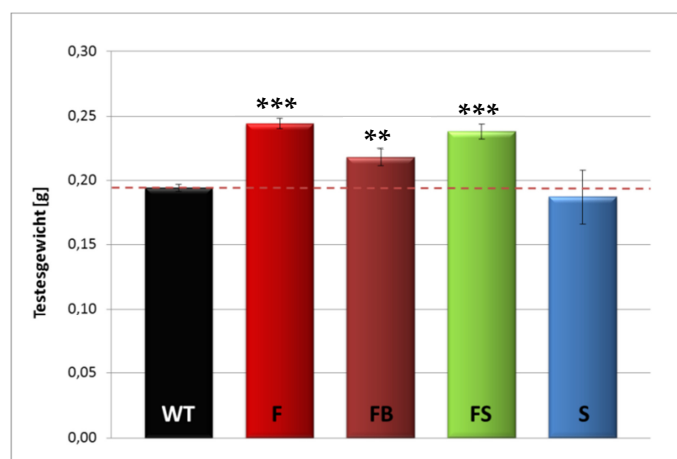


Abbildung 3-4. Testesgewicht adulter Mäuse, Mittelwerte mit Standardfehler, n = 17 (WT); 9 (F); 7 (FB); 13 (FS); 2 (S). ANOVA, Vergleich zu WT: p < 0,001 (F); 0,002 (FB); <0,001 (FS); markiert durch Sternchen. F zu FB: p = 0,002. Vergleich zu S: p < 0,001 (F); 0,019 (FB); <0,001 (FS). Wildtyp-Niveau durch gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die FMRP-defizienten Mäuse (F, FB und FS) zeigen ein signifikant erhöhtes Testesgewicht gegenüber Wildtyp-Tieren; die Inaktivierung eines *Shank1*-Allels hat dagegen keinen Einfluss.

### 3.6 AKUSTISCH AUSGELÖSTE KRAMPFANFÄLLE

Die für FMRP-defiziente Mäuse publizierte starke Anfälligkeit für akustisch ausgelöste Krampfanfälle haben wir bei unseren Mäusen untersucht (Dölen *et al.* 2007, Pacey *et al.* 2009, Westmark *et al.* 2011, Thomas *et al.* 2011a). Dafür wurden 19-21 Tage alte, männliche Mäuse für zwei Minuten mit einem 120 dB-lauten Alarmsignal beschallt. Während dies bei keiner der untersuchten Wildtyp-Mäuse Krampfanfälle hervorrufen konnte, kam es bei einem Anteil der Knockout-Mäuse zunächst zu einem wilden Laufverhalten, teilweise gefolgt von Krämpfen, *Status epilepticus* und Eintritt des Todes. Es erlitten 50,0 % (F) bzw. 83,3 % (FB) der *Fmr1*-Knockout-Mäuse Krämpfe, die zum Teil in den *Status epilepticus* mündeten und in 35,7 % (F) bzw. 41,7 % (FB) der Fälle zum Tode führten. Die zusätzliche Ausschaltung eines *Shank1*-Allels veränderte diesen Phänotyp nicht, bei den FS-Mäusen hat ein Anteil von 50,0 % Krämpfe bis hin zum *Status epilepticus* erlitten und 25,0 % der FS-Mäuse verstarben (Tabelle 3-1). Somit liegen die Werte der FS-Mäuse zwischen den Werten für F- und FB-Tiere und es kann für diesen Phänotyp keine Kompensation erreicht werden.

**Tabelle 3-1. Akustisch ausgelöste Krampfanfälle.**

Genotyp	Tieranzahl	wildes Laufen	Krämpfe	<i>Status epilepticus</i>	Tod
WT	9	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
F	14	50,0 %	42,9 %	35,7 %	35,7 %
FB	12	83,3 %	83,3 %	75,0 %	41,7 %
FS	12	50,0 %	50,0 %	50,0 %	25,0 %

### 3.7 ANALYSE DENDRITISCHER DORNEN MITTELS GOLGI-COX-FÄRBUNG

Um mögliche Veränderungen der dendritischen Dornen zu analysieren, wurden einzelne Neurone in Gehirnen von Wildtyp- und genetisch veränderten Mäusen im Alter von vier (juvenil) oder zwölf (adult) Wochen nach der Golgi-Cox-Methode gefärbt. Von der Golgi-Cox-Färbung werden 1-10 % der Neurone erfasst, sodass eine Betrachtung einzelner Dendriten möglich wird; Axone werden lediglich am Ansatz gefärbt. An 200 µm dicken Gehirnschnitten erfolgte die mikroskopische Analyse. Dabei betrachteten wir apikale Dendriten aus Ebene 2/3 des visuellen Cortex und unterschieden dabei zwischen proximalen (50-150 µm vom Soma entfernt) und distalen (150-250 µm vom Soma entfernt) Dendritenabschnitten (Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6).

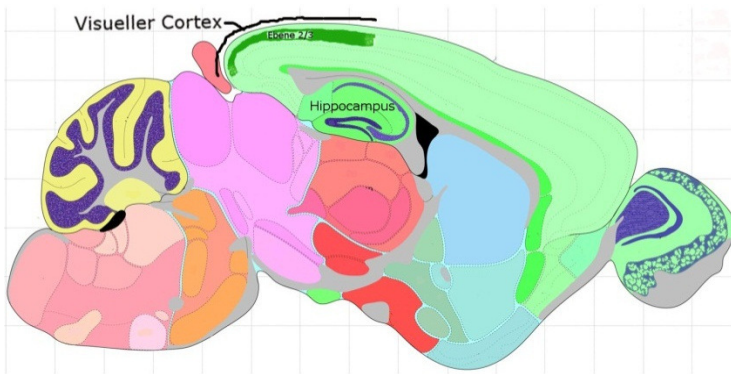


Abbildung 3-5. Schema eines sagittalen Schnittes durch das Mäusegehirn mit Darstellung des visuellen Cortex und Hervorhebung der Schicht 2/3 durch dunkelgrüne Einfärbung. Modifiziert nach *Allen Mouse Atlas*.

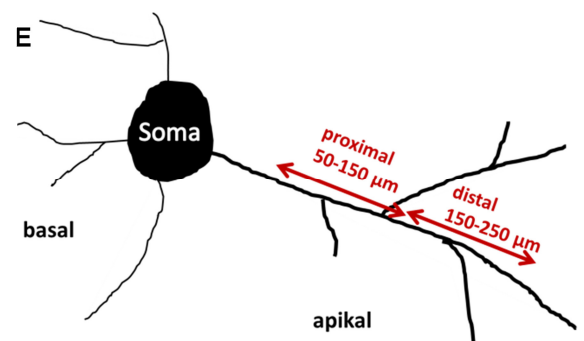
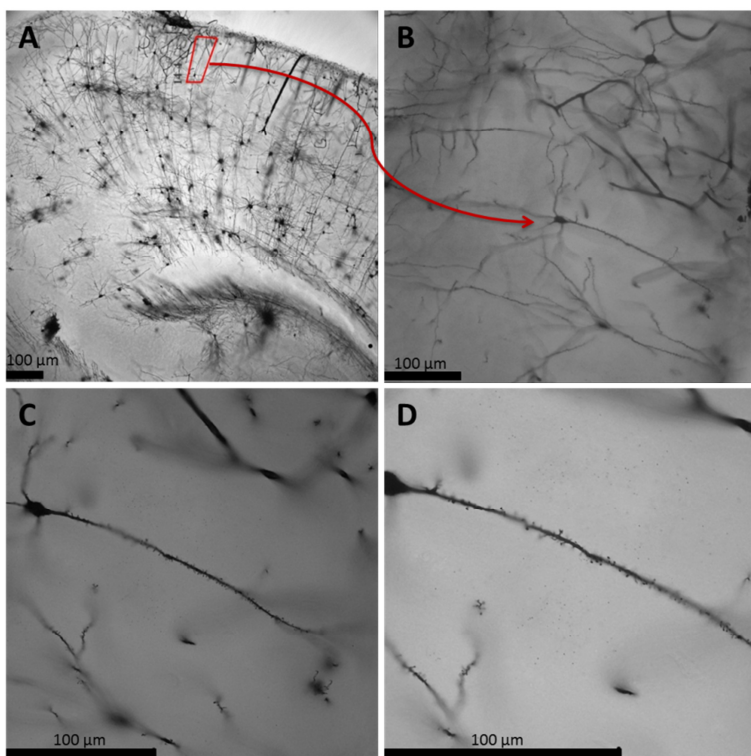


Abbildung 3-6. Lichtmikroskopische Aufnahmen des visuellen Cortex in verschiedenen Vergrößerungen. [A] 5x-Objektiv, das markierte Neuron wurde für die Analyse ausgewählt. [B] 20x-Objektiv. [C] 40x-Objektiv. [D] 63x-Objektiv, die dendritischen Dornen sind deutlich erkennbar. [E] schematische Darstellung eines Neurons mit Kennzeichnung der von uns untersuchten Bereiche.

Pro Maus wurden 8-12 Dendriten analysiert; bei den Genotypen WT, F und FS wurden jeweils je 3-4 juvenile und adulte Mäuse untersucht, während die Genotypen FB und S lediglich anhand einer adulten Maus betrachtet wurden (Tabelle 3-2). Die Anzahl der untersuchten Dornen pro Maus liegt zwischen 341 und 1225 Dornen für proximale und zwischen 291 und 1261 Dornen für distale Abschnitte (Tabelle 3-3). Die Analyse erfolgte verblindet.

**Tabelle 3-2. Übersicht über die der Golgi-Cox-Analyse zugrunde liegende Dornenzahl und Strecke der Dendriten je Genotyp und Alter.**

Alter	Genotyp	Tieranzahl	proximal		distal	
			Dornenzahl	Strecke [ $\mu\text{m}$ ]	Dornenzahl	Strecke [ $\mu\text{m}$ ]
juvenil	WT	4	2196	2483	2205	2287
	F	3	1940	2327	2318	2474
	FS	3	2233	2347	2411	2479
adult	WT	4	1938	2694	1190	1544
	F	3	2671	4197	2117	3066
	FS	3	2245	3529	1883	2572
	FB	1	541	787	612	792
	S	1	759	955	876	953

**Tabelle 3-3. Übersicht über die Anzahl der ausgewerteten Dornen je Tier unter Angabe des Genotyps und der bei der verblindeten Auswertung verwendeten Codierungsnummer.**

Alter	Maus	Dornenzahl	
		proximal	distal
juvenil	WT 6	396	429
	WT 9	489	291
	WT 19	904	402
	WT 17	415	427
	F 8	410	376
	F 15	700	432
	F 16	844	1262
	FS 5	341	384
	FS 14	672	617
	FS 18	1225	1100
adult	WT 22	358	326
	WT 20	794	/
	WT 27	786	864
	F 25	392	372
	F 21	726	/
	F 26	428	498
	F 34	552	578
	F 38	573	669
	FS 23	676	716
	FS 24	740	/
	FS 35	442	633
	FS 41	387	534
	FB 37	541	612
S 28	759	876	

### 3.7.1 Dornendichte

Bei juvenilen und adulten Mäusen wurde die Dichte dendritischer Dornen in den proximalen und distalen Dendritenabschnitten bestimmt. Bei den adulten Mäusen wurde zusätzlich zu den Genotypen WT, F und FS jeweils eine FB- und S-Maus betrachtet. Für die Auswertung wurde je Maus der Quotient aus der Gesamtanzahl der gezählten Dornen und der Gesamtstrecke gebildet, und hieraus je Genotyp ein Mittelwert für die durchschnittliche Dornendichte errechnet. Bei juvenilen Mäusen ergibt sich für proximale Bereiche eine durchschnittliche Dornendichte von etwas unter 1 Dorn/ $\mu\text{m}$  (WT: 0,97; F: 0,86; FS: 0,92 Dornen/ $\mu\text{m}$ ; Abbildung 3-7, A) Bei allen Genotypen ist die durchschnittliche Dornendichte für distale Dendritenabschnitte minimal, aber nicht signifikant höher als für proximale Abschnitte (WT: 0,98; F: 0,92; FS: 1,00 Dornen/ $\mu\text{m}$ ). Allerdings gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Bei adulten Mäusen ist die durchschnittliche Dornendichte etwas geringer als bei juvenilen (Abbildung 3-7, B). Auch hier ist die Dornendichte in den proximalen Dendritenabschnitten etwas geringer (WT: 0,70; FB: 0,69; F: 0,64; FS: 0,64; S: 0,79) als in den distalen Dendritenabschnitten (WT: 0,73; FB: 0,77; F: 0,70; FS: 0,74; S: 0,92), wobei der Unterschied nicht signifikant ist. Die Genotypen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die eine untersuchte S-Maus zeigt eine leicht erhöhte Dornendichte. Zusammenfassend hat weder der FMRP-Verlust noch die Reduktion der Shank1-Konzentration einen signifikanten Einfluss auf die Dornendichte.

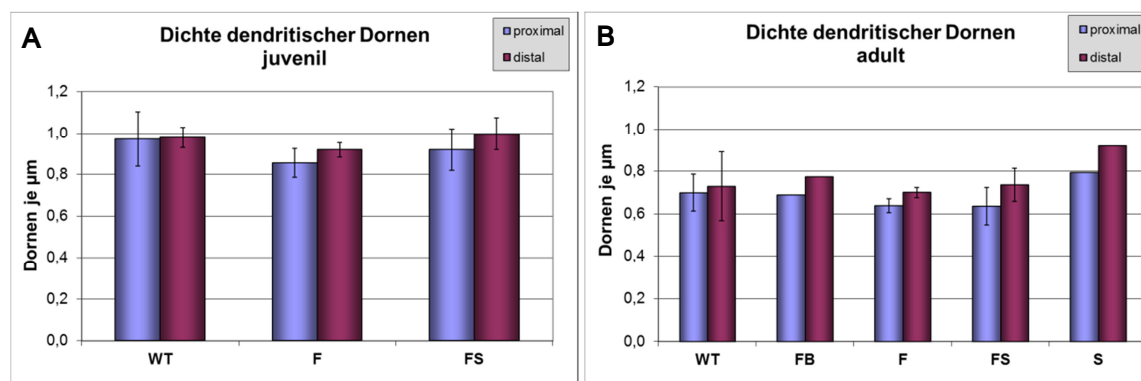


Abbildung 3-7. Dichte dendritischer Dornen, Mittelwerte mit Standardfehler. Weder bei juvenilen noch bei adulten Mäusen gibt es signifikante Unterschiede in der Dornendichte zwischen den Genotypen und zwischen proximalen und distalen Dendritenabschnitten. [A] Juvenile Mäuse, n = 4 (WT), 3 (F), 3 (FS). [B] Adulte Mäuse, n = 4 (WT), 3 (F), 3 (FS), 1 (FB), 1 (S).

### 3.7.2 Dornenmorphologie

Zur Erfassung der Dornenmorphologie wurde die Länge und die maximale Breite der einzelnen Dornen erfasst, und zusätzlich für jeden einzelnen dendritischen Dorn der Quotient hieraus gebildet. Je Genotyp WT, F und FS gehen etwa 2000 Dornen in die Auswertung ein (Tabelle 3-2). Zur grafischen Darstellung wurde eine Kurve der „kumulativen Prozente“ erstellt. Dabei wird der Anteil an Dornen, z.B. einer bestimmten Länge, als sich summierender Prozentwert angegeben. Bei den proximalen Dendritenabschnitten juveniler Mäuse (Abbildung 3-8, A) haben zum Beispiel ca. 35 % der Dornen eine Länge von maximal 1,0  $\mu\text{m}$ ; 80 % der Dornen haben eine Länge von höchstens 2,0  $\mu\text{m}$ . Am Verlauf der Kurve kann man erkennen, ob eher kurze oder eher lange Dornen vorliegen, da die Kurve entsprechend steiler oder flacher verläuft. Eine Kurve der kumulativen Prozente wurde, mit Unterscheidung des Alters und des Dendritenabschnittes, je Genotyp für die Parameter Dornenlänge, Dornenbreite und dem Quotienten erstellt. Eine große Darstellung der Kurven befindet sich im Anhang. Zusätzlich wurden für die analysierten Parameter Mittelwerte je Genotyp gebildet.

#### 3.7.2.1 Dornenlänge

In den proximalen Dendritenabschnitten juveniler Mäuse haben bei den WT- und F- und auch FS-Mäusen ca. 80 % der Dornen eine Länge von höchstens 2,0  $\mu\text{m}$  und die Kurven kumulativer Prozente verlaufen sehr ähnlich. Auch die Mittelwerte der Länge proximaler Dornen der verschiedenen Genotypen unterscheiden sich hier nicht signifikant voneinander (WT: 1,361  $\mu\text{m}$ ; F: 1,368  $\mu\text{m}$ ; FS: 1,359  $\mu\text{m}$ ). Während sich für WT- und F-Mäuse das gleiche Bild in den distalen Dendritenabschnitten juveniler Mäuse ergibt, haben hier jedoch bei den FS-Mäusen lediglich ca. 72 % der Dornen eine Länge von höchstens 2,0  $\mu\text{m}$  (Abbildung 3-8, B). Das heißt, bei den FS-Mäusen ist ein größerer Anteil der Dornen länger als 2,0  $\mu\text{m}$ . Auch der Mittelwert der Dornenlänge der FS-Mäuse ist signifikant höher als bei WT- und F-Tieren (WT: 1,341  $\mu\text{m}$ ; F: 1,354  $\mu\text{m}$ ; FS: 1,462  $\mu\text{m}$ ; Abbildung 3-8). Bei adulten Mäusen liegt weder in proximalen noch in distalen Dendritenabschnitten ein Unterschied in der Dornenlänge zwischen WT- und F-Mäusen vor. In den proximalen Abschnitten adulter Mäuse weisen die FS-Tiere signifikant längere Dornen als WT- und S-Mäuse auf (Abbildung 3-8, C. Mittelwerte der Dornenlänge: WT: 1,226  $\mu\text{m}$ ; F: 1,269  $\mu\text{m}$ ; FB: 1,271  $\mu\text{m}$ ; FS: 1,309  $\mu\text{m}$ ; S: 1,214  $\mu\text{m}$ ; Tabelle 3-4). In den distalen Dendritenabschnitten adulter Mäuse sind die Dornen der FS-Mäuse



signifikant kürzer als bei F-Mäusen (Abbildung 3-8, D. Mittelwerte der Dornenlänge: WT: 1,253  $\mu\text{m}$ ; F: 1,283  $\mu\text{m}$ ; FB: 1,218  $\mu\text{m}$ ; FS: 1,226  $\mu\text{m}$ ; S: 1,258  $\mu\text{m}$ ; Tabelle 3-4).

Zusammengenommen ist durch FMRP-Defizienz keine signifikante Veränderung der Dornenlänge erkennbar. Die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels hingegen führt in zwei von vier analysierten Situationen (juvenil/distal, adult/proximal) zu längeren dendritischen Dornen gegenüber Wildtyp-Tieren und in einer (juvenil/distal) gegenüber F-Mäusen. In distalen Dendritenabschnitten adulter Mäuse haben FS-Tiere kürzere Dornen als WT- und F-Mäuse. Der alleinige Verlust eines funktionellen *Shank1*-Allels führt in adulten Mäusen zu keiner Veränderung der Dornenlänge.

Genotyp	Dornenlänge			
	juvenil		adult	
	proximal	distal	proximal	distal
	MW [ $\mu\text{m}$ ]	MW [ $\mu\text{m}$ ]	MW [ $\mu\text{m}$ ]	MW [ $\mu\text{m}$ ]
WT	1,361	1,341	1,226	1,253
F	1,368	1,354	1,269	1,283
FB	\	\	1,271	1,218
FS	1,359	§# 1,462	# 1,309	§# 1,226
S	\	\	1,214	1,258

Tabelle 3-4. Mittelwerte der Dornenlänge. Signifikante Unterschiede zu WT sind markiert durch ein Doppelkreuz; signifikante Unterschiede zu F-Mäusen durch ein Paragraphenzeichen. ANOVA, nachfolgend Angabe der p-Werte. Juvenil/distal: WT zu FS: <0,001/F zu FS: <0,001; adult/proximal: WT zu FS: 0,002/FS zu S: 0,008; adult/distal nur im T-Test: F zu FS: 0,006/F zu FB: 0,034.

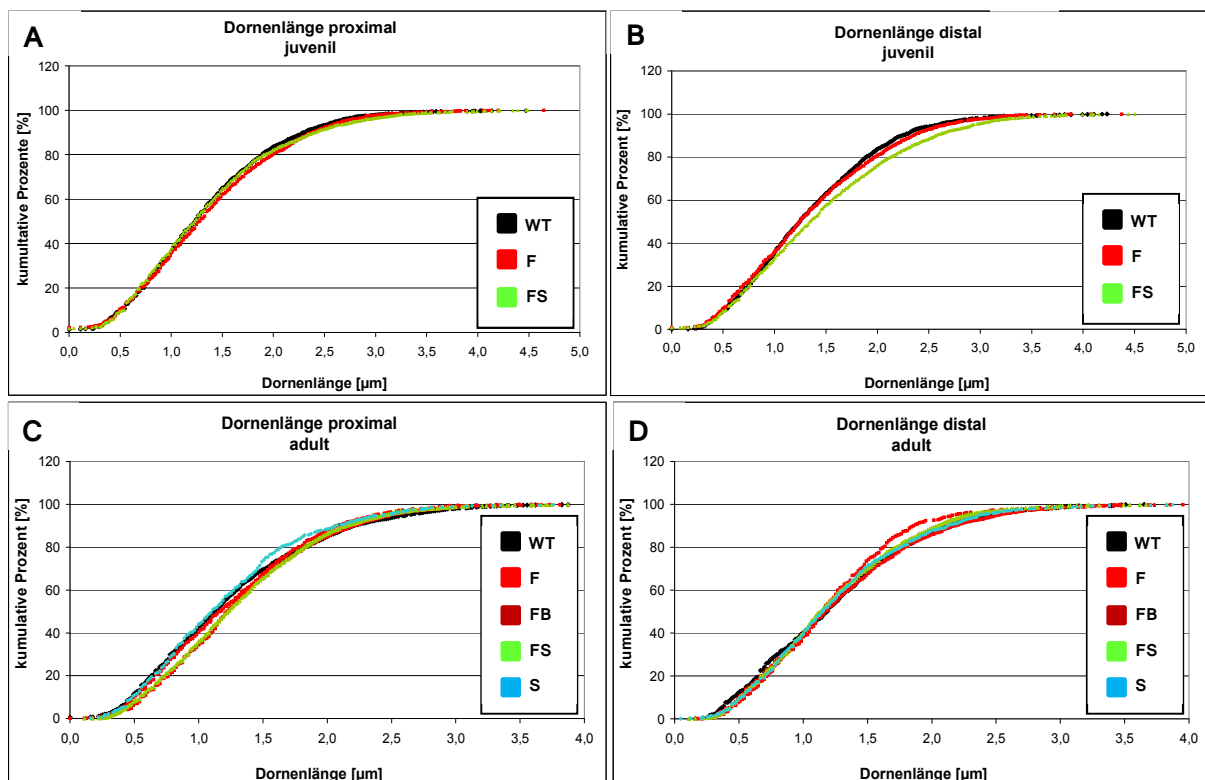


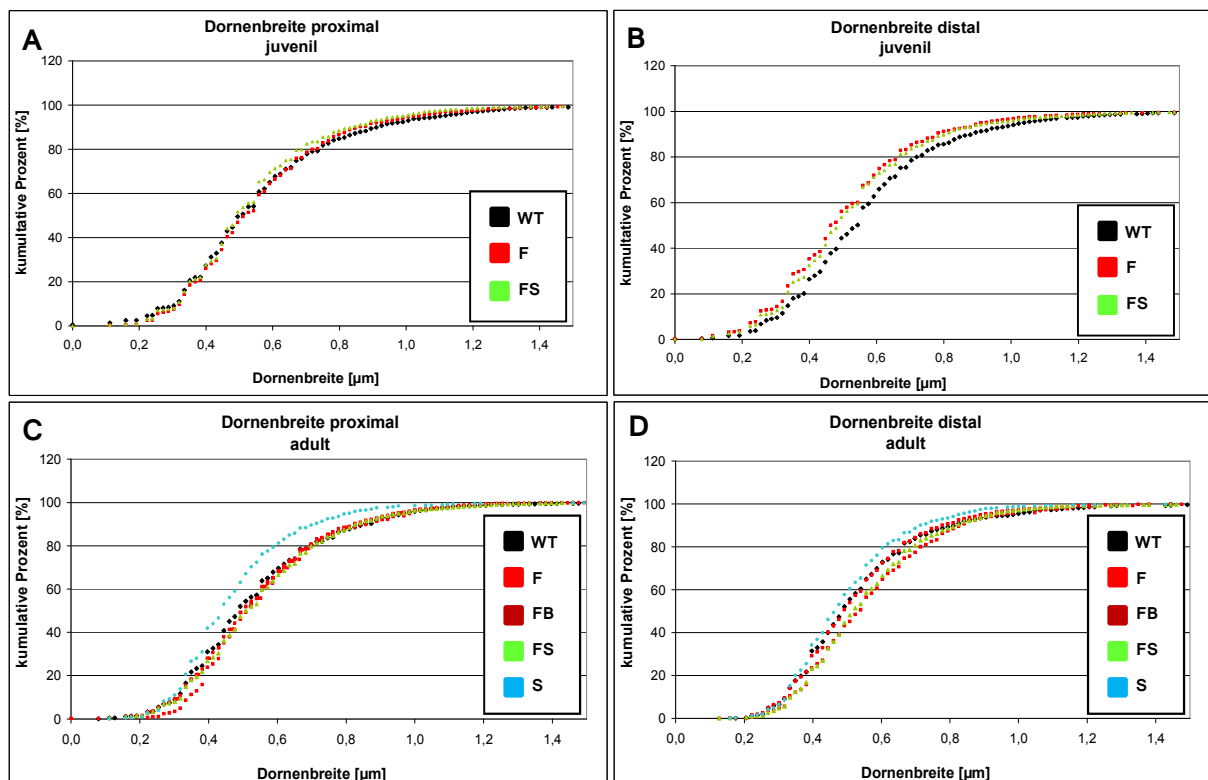
Abbildung 3-8. Dornenlänge an apikalen Dendriten des visuellen Cortex, Ebene 2/3. n = 4 (WT), 3 (F), 3 (FS) bei juvenilen Mäusen und n = 4 (WT), 3 (F), 3 (FS), 1 (FB), 1 (S) bei adulten Mäusen. [A] Proximale Dendritenabschnitte juveniler Mäuse. [B] Distale Dendritenabschnitte juveniler Mäuse. [C] Proximale Dendritenabschnitte adulter Mäuse. [D] Distale Dendritenabschnitte adulter Mäuse.

### 3.7.2.2 Dornenbreite

In den proximalen Dendritenabschnitten juveniler Mäuse liegt kein signifikanter Unterschied in der Dornenbreite zwischen WT- und F-Mäusen vor, jedoch sind die Dornen der FS-Mäuse signifikant schmaler gegenüber WT- und F-Mäusen (Abbildung 3-9, A: höhere Kurve der FS-Mäuse. Mittelwerte der Dornenbreite: WT: 0,580  $\mu\text{m}$ ; F: 0,574  $\mu\text{m}$ ; FS: 0,546  $\mu\text{m}$ ; Tabelle 3-5). In den distalen Dendritenabschnitten juveniler Mäuse sind sowohl die Dornen der FS- als auch der F-Mäuse signifikant schmaler als die der WT-Tiere (Abbildung 3-9, B. Mittelwerte der Dornenbreite: WT: 0,536  $\mu\text{m}$ ; F: 0,499  $\mu\text{m}$ ; FS: 0,505  $\mu\text{m}$ ; Tabelle 3-5). In proximalen Abschnitten adulter Tiere hingegen liegt erneut kein signifikanter Unterschied in der Breite dendritischer Dornen zwischen WT- und F-Tieren vor, und auch die Dornenbreite bei FS-Mäusen unterscheidet sich nicht signifikant von WT- oder F-Tieren. Hier hat lediglich die S-Maus signifikant schmalere Dornen als alle anderen Genotypen (Abbildung 3-9, C. Mittelwert der Dornenbreite: WT: 0,544  $\mu\text{m}$ ; F: 0,545  $\mu\text{m}$ ; FB: 0,564  $\mu\text{m}$ ; FS: 0,556  $\mu\text{m}$ ; S: 0,482  $\mu\text{m}$ ; Tabelle 3-5). In distalen Dendritenabschnitten adulter Mäusen schließlich unterscheidet sich die durchschnittliche Dornenbreite von FS-, FB- und S-Mäusen signifikant von der bei WT- und F-Mäusen ermittelten durchschnittlichen Dornenbreite; zwischen WT- und F-Mäusen liegt hier erneut kein signifikanter Unterschied in der Dornenbreite vor (Abbildung 3-9, D. Mittelwert der Dornenbreite: WT: 0,540  $\mu\text{m}$ ; F: 0,533  $\mu\text{m}$ ; FB: 0,574  $\mu\text{m}$ ; FS: 0,561  $\mu\text{m}$ ; S: 0,503  $\mu\text{m}$ ; Tabelle 3-5).

**Tabelle 3-5. Mittelwerte der Dornenbreite. Signifikante Unterschiede zu WT-Mäusen sind markiert durch ein Doppelkreuz; signifikante Unterschiede zu F-Mäusen durch ein Paragrafenzeichen.** ANOVA, nachfolgend Angabe der p-Werte. Juvenil/proximal: WT zu F/FS <0,001; juvenil/distal: WT zu F/FS <0,001; adult/proximal: WT/F/FB/FS zu S <0,001; adult/distal: WT zu FS 0,005/WT zu FB 0,001/WT zu S <0,001/F zu FB/FS/S: <0,001/FB/FS zu S: <0,001.

Genotyp	Dornenbreite			
	juvenil		adult	
	proximal	distal	proximal	distal
	MW [ $\mu\text{m}$ ]	MW [ $\mu\text{m}$ ]	MW [ $\mu\text{m}$ ]	MW [ $\mu\text{m}$ ]
WT	0,580	0,537	0,544	0,540
F	0,575	#0,499	0,545	0,533
FB	\	\	0,564	§#0,574
FS	§#0,546	#0,505	0,556	§#0,561
S	\	\	§#0,482	§#0,503



**Abbildung 3-9.** Dornenbreite an apikalen Dendriten des visuellen Cortexes, Schicht 2/3.  $n = 4$  (WT), 3 (F), 3 (FS) bei juvenilen Mäusen und  $n = 4$  (WT), 3 (F), 3 (FS), 1 (FB), 1 (S) bei adulten Mäusen. [A] Proximale Dendritenabschnitte juveniler Mäuse. [B] Distale Dendritenabschnitte juveniler Mäuse. [C] Proximale Dendritenabschnitte adulter Mäuse. [D] Distale Dendritenabschnitte adulter Mäuse.

Zusammengenommen hat in unseren Analysen die FMRP-Defizienz keinen einheitlichen Einfluss auf die Dornenbreite, denn F- unterschieden sich von WT-Mäusen lediglich in einer von vier analysierten Situationen (juvenil/distal) durch signifikant schmalere Dornen, während FB-Mäuse sich von Wildtypen ebenfalls nur in einer Untersuchungssituation (adult/distal) durch signifikant breitere Dornen unterscheiden. Die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels führt offenbar zu schmalere dendritische Dornen als bei Wildtyp-Mäusen, was wir in zwei von vier analysierten Situationen (juvenil/proximal, juvenil/distal) festgestellt haben. In einer Untersuchungssituation (juvenil/proximal) haben FS-Mäusen auch signifikant schmalere Dornen als F-Tiere, in distalen Dendritenabschnitten adulter Mäuse hingegen signifikant breitere Dornen als WT- und F-Mäuse. Die alleinige Inaktivierung eines *Shank1*-Allels führt in adulten Mäusen zu signifikant schmalere dendritische Dornen verglichen mit jenen von Wildtyp- und F-Tieren

### 3.7.2.3 Quotient Dornenlänge/Dornenbreite

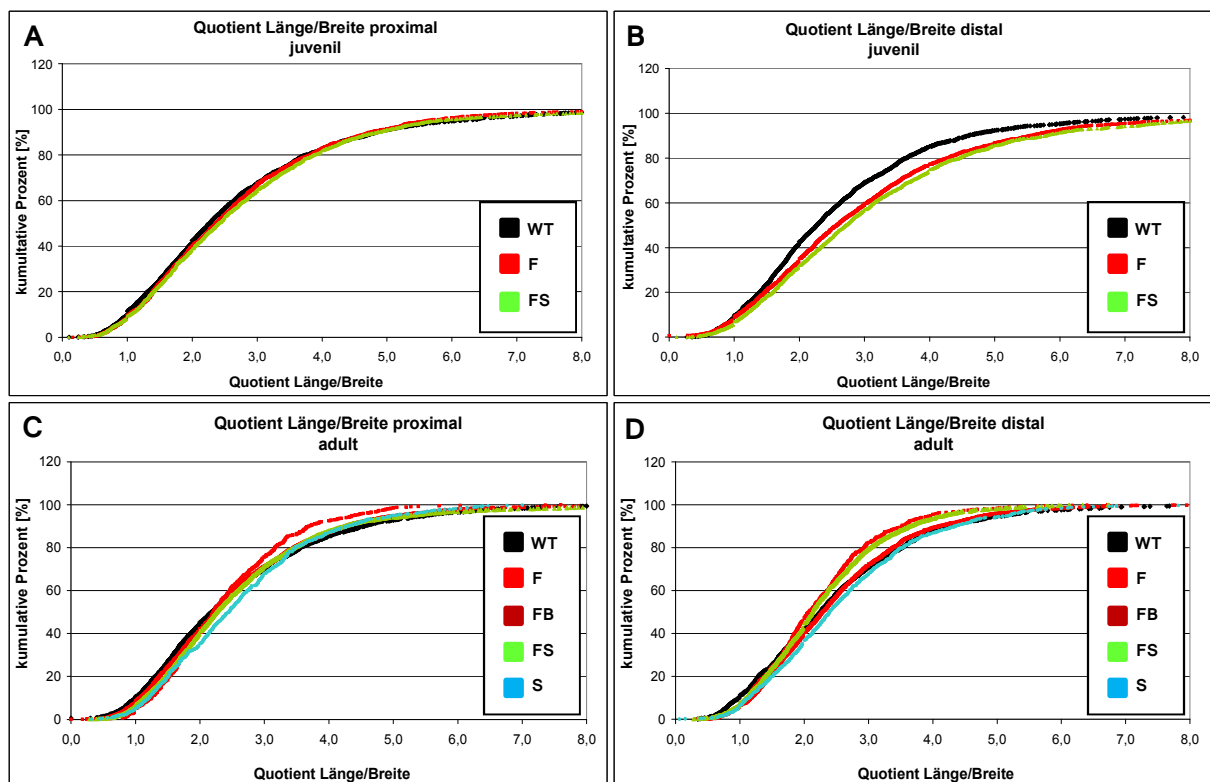
Der Quotient aus Dornenlänge und Dornenbreite dient als ein Näherungswert für die Morphologie des Dorns. Ein eher filopodienförmiger Dorn weist einen höheren, ein pilzförmiger Dorn hingegen einen niedrigeren Quotienten auf. Die durchschnittlichen Quotienten von WT- und F-Mäusen unterscheiden sich nur in einer Untersuchungssituation (juvenil/distal) signifikant voneinander. Die F-Tiere weisen hier einen höheren Quotienten auf und haben somit vermehrt filopodienförmige Dornen (Abbildung 3-10, B. Mittelwert des Quotienten: WT: 2,863  $\mu\text{m}$ : F: 3,129  $\mu\text{m}$ ; FS: 3,300  $\mu\text{m}$ ; Tabelle 3-6). In den anderen drei Situationen stellen wir keinen Unterschied beim Quotienten aus Dornenlänge und Dornenbreite zwischen WT- und F-Mäusen fest. Die FB-Maus unterscheidet sich in proximalen Dendritenabschnitten adulter Tiere durch pilzförmigere Dornen signifikant von den F-Mäusen (Abbildung 3-10, C. Mittelwert des Quotienten: WT: 2,464  $\mu\text{m}$ : F: 2,514  $\mu\text{m}$ : FB: 2,345  $\mu\text{m}$ ; FS: 2,604  $\mu\text{m}$ ; S: 2,621  $\mu\text{m}$ ; Tabelle 3-6), und in distalen Dendritenabschnitten adulter Tiere von WT- und F-Mäusen (Abbildung 3-10, D. Mittelwert des Quotienten: WT: 2,497  $\mu\text{m}$ : F: 2,500  $\mu\text{m}$ : FB: 2,227  $\mu\text{m}$ ; FS: 2,270  $\mu\text{m}$ ; S: 2,614  $\mu\text{m}$ ; Tabelle 3-6).

Die Dornen der FS-Mäuse weisen in proximalen Abschnitten juveniler Mäuse einen signifikant höheren durchschnittlichen Quotienten auf als WT- und F-Mäuse, und sind somit eher filopodienförmig (Abbildung 3-10, A: niedrigere Kurve der FS-Mäuse; Mittelwert des Quotienten: WT: 2,654  $\mu\text{m}$ : F: 2,638  $\mu\text{m}$ ; FS: 2,761  $\mu\text{m}$ ). Auch in den distalen Abschnitten juveniler Mäuse ergibt sich für die Dornen von FS-Tieren ein signifikant höherer durchschnittlicher Quotient als bei WT-Mäusen (Abbildung 3-10, B; Tabelle 3-6). In proximalen Abschnitten adulter Tiere haben sowohl FS- als auch S-Mäuse einen signifikant höheren durchschnittlichen Quotienten als WT- und FB-Mäuse (Abbildung 3-10, C; Tabelle 3-6). In den distalen Abschnitten adulter Mäuse schließlich ergibt sich bei den FS-Mäusen ein signifikant niedrigerer durchschnittlicher Quotient als bei den WT- und F-Mäusen, was auf pilzförmigere Dornen hinweist.

Die Dornen der S-Maus weisen bei dem untersuchten adulten Tier einen signifikant höheren durchschnittlichen Quotienten auf und sind somit eher filopodienförmig; wie auch für die FB- bleibt für die S-Maus zu beachten, dass nur eine einzige Maus analysiert wurde.

**Tabelle 3-6. Mittelwerte des Quotienten Länge/Breite. Signifikante Unterschiede zu WT-Mäusen sind markiert durch ein Doppelkreuz; signifikante Unterschiede zu F-Mäusen durch ein Paragrafenzeichen. ANOVA, nachfolgend Angabe der p-Werte. Juvenil/proximal: WT zu FS 0,005/F zu FS 0,002; juvenil/distal: WT zu F/FS 0,000/F zu FS <0,001; adult/proximal: WT zu FS 0,012/WT zu S 0,040/F zu FB 0,044/FB zu FS 0,002/FB zu S 0,006; adult/distal: WT zu FB/FS <0,001/WT zu S 0,033/F zu FB/FS <0,001/F zu S: 0,022/FB/FS zu S: <0,001.**

Genotyp	Quotient Länge/Breite			
	juvenil		adult	
	proximal	distal	proximal	distal
	MW [µm]	MW [µm]	MW [µm]	MW [µm]
WT	2,654	2,863	2,464	2,497
F	2,638	# 3,129	2,514	2,500
FB	\	\	§ 2,345	§# 2,227
FS	§# 2,761	§# 3,300	# 2,604	§# 2,270
S	\	\	# 2,621	§# 2,614

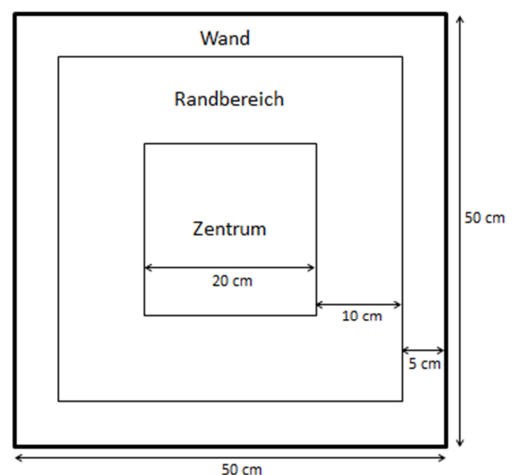


**Abbildung 3-10. Quotient aus Dornenlänge und Dornenbreite an apikalen Dendriten des visuellen Cortexes, Ebene 2/3. n = 4 (WT), 3 (F), 3 (FS) bei juvenilen Mäusen und n = 4 (WT), 3 (F), 3 (FS), 1 (FB), 1 (S) bei adulten Mäusen. [A]) Proximale Dendritenabschnitte juveniler Mäuse. [B]) Distale Dendritenabschnitte juveniler Mäuse. [C]) Proximale Dendritenabschnitte adulter Mäuse. [D]) Distale Dendritenabschnitte adulter Mäuse.**

Bei unseren Analysen von Dornenlänge, Dornenbreite und dem sich daraus ergebenden Quotienten finden wir zusammengenommen keine konstant vorhandene Veränderung bei *Fmr1*-Knockout-Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen. Die FS-Mäuse jedoch zeigen in allen vier Untersuchungssituationen signifikant verschiedene Quotienten im Vergleich zu Wildtyp- und in drei Situationen auch zu F-Mäusen. Während bei den juvenilen Mäusen und bei den proximalen Dendritenabschnitten adulter Tiere die FS-Mäuse signifikant höhere Quotienten aufweisen als WT-Tiere und somit eher filopodienförmige Dornen haben, ist dies bei den distalen Dendritenabschnitten adulter Mäuse genau umgekehrt. Hier ist der mittlere Quotient der FS-Mäuse signifikant geringer als bei WT-Mäusen, was auf eher pilzförmige Dornen hinweist. Im Vergleich von F- und FS-Mäusen finden wir signifikante Unterschiede bei den juvenilen Mäusen, wobei hier die Quotienten der FS-Mäuse signifikant höher sind; die FS-Mäuse haben also eher filopodienförmige Dornen im Vergleich zu F-Tieren. Auch bei den distalen Dendritenabschnitten adulter Mäuse unterscheiden sich F- und FS-Mäuse signifikant. Ebenso wie im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren ist dabei der mittlere Quotient der FS-Mäuse signifikant geringer.

### 3.8 OPEN FIELD

Beim sogenannten *Open Field*-Versuch wird eine Maus in ein hell erleuchtetes, quadratisches Versuchsareal gesetzt und das Laufverhalten durch eine Videokamera über die Dauer von 15 Minuten erfasst. Dabei werden bestimmte Zonen des Versuchsareals unterschieden: das Zentrum umschreibt den mittleren Bereich; daran schließt sich mit einer Breite von 10 cm der Randbereich an; der Wandbereich schließlich umfasst die letzten 5 cm bis zur jeweiligen Wand (Abbildung 3-11). Über die zurückgelegte Laufstrecke kann eine Aussage über die allgemeine Aktivität gemacht werden. Aus der Aufenthaltsdauer im Zentrum können Rückschlüsse über die Ängstlichkeit der



**Abbildung 3-11.** *Open Field*-Areal mit Markierung der Zonen Zentrum, Randbereich, Wand und Angabe der Entfernungen. Im *Open Field*-Versuch wird die allgemeine Aktivität und Ängstlichkeit untersucht.

Mäuse gezogen werden. Dies beruht auf der Tatsache, dass Mäuse tendenziell hell ausgeleuchtete und freie Flächen meiden, da sie dort für mögliche Feinde gut sichtbar und vergleichsweise schutzlos sind (Prut & Belzung 2003).

Die Wildtyp-Mäuse legen während der untersuchten 15 Minuten eine durchschnittliche Strecke von 6987 cm zurück, wohingegen alle Knockout-Mäuse signifikant geringere Strecken zurücklegen (F: 6138 cm, FB: 5986 cm, FS: 5744 cm, S: 6326 cm; Abbildung 3-12, A). Da von der ursprünglichen *Fmr1*-Knockout-Linie (FB) lediglich zwei Mäuse untersucht wurden, wird in der statistischen Analyse für diese Werte keine Signifikanz erzielt. Bei einer Aufschlüsselung in Intervalle von 5 Minuten wird deutlich, dass die Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen zu Beginn des Experiments am größten sind und sich die Werte der verschiedenen Genotypen im Verlauf des Versuches einander annähern (Abbildung 3-12, B). Zudem kann man gut den zu erwartenden Habituationseffekt beobachten: alle Mäuse sind anfänglich am aktivsten, da das neue Areal erkundet wird. Mit fortschreitender Zeit nimmt die Aktivität ab. Ein Kompensationseffekt des beobachteten Phänotyps der FMRP-defizienten Mäuse kann durch den zusätzlichen *Shank1*-Knockout nicht herbeigeführt werden: die FS-Mäuse legen eine ähnliche Strecke wie die F-Mäuse zurück.

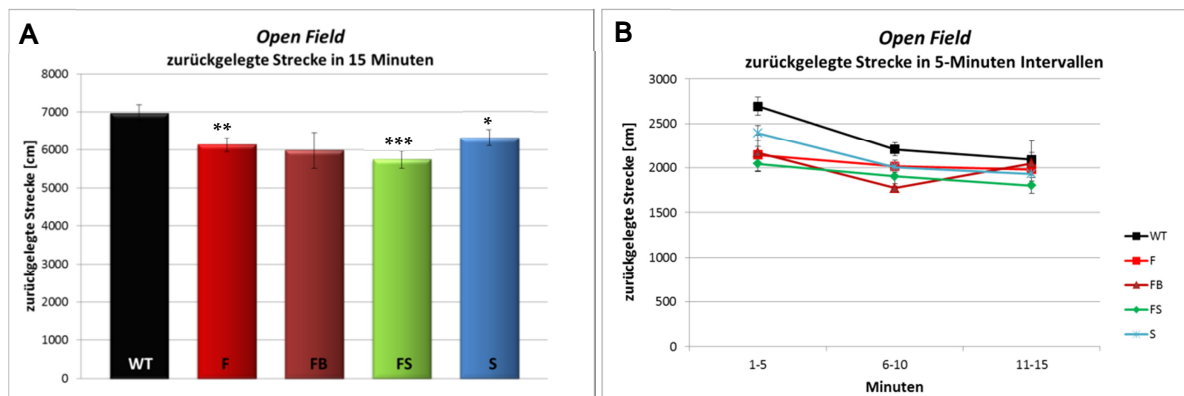


Abbildung 3-12. *Open Field*-Ergebnisse. [A] Gesamte in den untersuchten 15 Minuten zurückgelegte Strecke im *Open Field*-Test, Mittelwerte mit Standardfehler. Alle Knockout-Mäuse legen eine signifikant kürzere Strecke zurück als Wildtyp-Tiere (N = 20 (WT), 22 (F), 2 (FB), 24 (FS), 20 (S). ANOVA, Vergleiche zu WT:  $p = 0,009$  (F);  $<0,001$  (FS);  $0,045$  (S). [B] Zurückgelegte Strecke im *Open Field*-Test in 5-Minuten-Intervallen, Mittelwerte mit Standardfehler. Anhand der mit der Zeit abnehmenden gelaufenen Strecke wird der Habituationseffekt deutlich.

Die im Zentrum des Areals verbrachte Zeit wird zur Beurteilung der allgemeinen Ängstlichkeit herangezogen (Prut & Belzung 2003). Keine der untersuchten Knockout-Mäuse unterscheidet sich in diesem Parameter signifikant von Wildtyp-Tieren. Die F-Mäuse zeigen einen Trend zu einem längeren Aufenthalt im Zentrum, während bei den zwei untersuchten FB-Mäusen eine kürzere Verweildauer im Zentrum vorliegt (Abbildung 3-13). Da die Werte sich in keinem Fall signifikant von den Wildtyp-Werten unterscheiden, kann man bei *Fmr1*-Knockout-Mäusen von keinem Unterschied in Bezug auf die Ängstlichkeit im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ausgehen. Die FS-Mäuse verbringen in etwa so viel Zeit im Zentrum wie Wildtyp-Mäuse. Mäuse mit einer alleinigen Inaktivierung eines *Shank1*-Allels verbringen signifikant weniger Zeit im Zentrum als F- und FS-Mäuse, doch der Unterschied zu WT-Tieren ist mit einem p-Wert von 0,108 nicht signifikant. Da sich FMRP-defiziente Mäuse in diesem Parameter nicht signifikant von WT-Tieren unterscheiden, ist es nicht möglich, einen Kompensationseffekt bei FS-Mäusen zu beobachten.

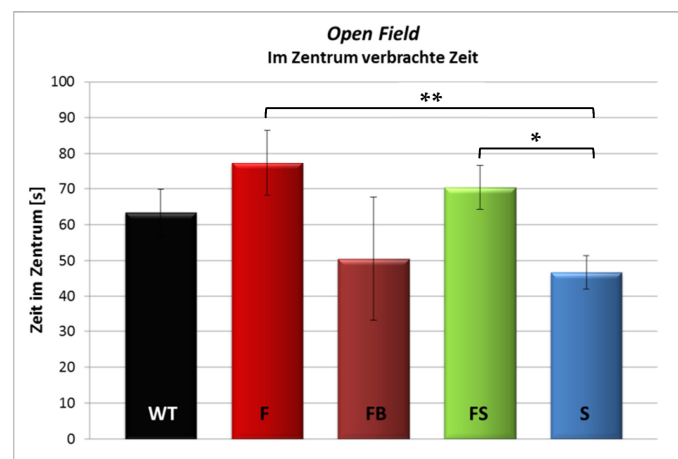
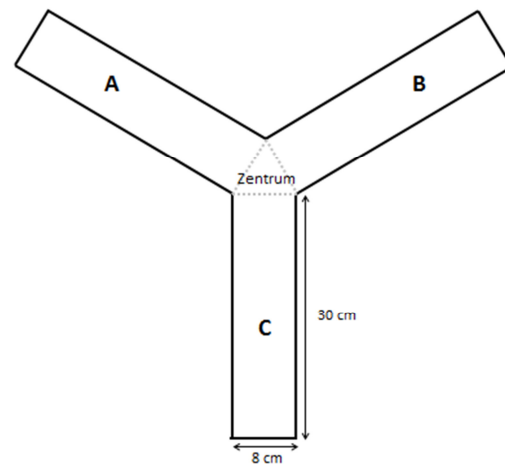


Abbildung 3-13. Im Zentrum verbrachte Zeit während des *Open Field*-Tests, Mittelwerte mit Standardfehler. Mäuse mit einem heterozygoten *Shank1*-Knockout verbringen signifikant weniger Zeit im Zentrum als FMRP-defiziente Mäuse mit oder ohne einen zusätzlichen heterozygoten *Shank1*-Knockout. (N = 20 (WT), 22 (F), 2 (FB), 24 (FS), 20 (S). ANOVA, F zu S: p = 0,003; FS zu S: p = 0,018; markiert durch Sternchen).



### 3.9 Y-MAZE

Das *Y-Maze*-Areal besteht aus drei Armen mit einem Zentrum (Abbildung 3-14). Mäuse kontrollieren ihre nähere Umgebung regelmäßig auf Veränderungen wie z. B. das Auftauchen von Nahrung oder Bedrohungen. Man erwartet daher, dass sie in einem solchen Areal die Arme abwechselnd erkunden. Für den Test wird die Maus in das Zentrum gesetzt und solange beobachtet, bis sie insgesamt 26 Eintritte in die Arme absolviert hat. Ein Eintritt ist definiert als ein erfolgter Übertritt mit allen vier Pfoten über die imaginäre Grenzlinie zwischen Zentrum und Arm (gestrichelte Linien in Abbildung 3-14). Nachdem die Maus einen

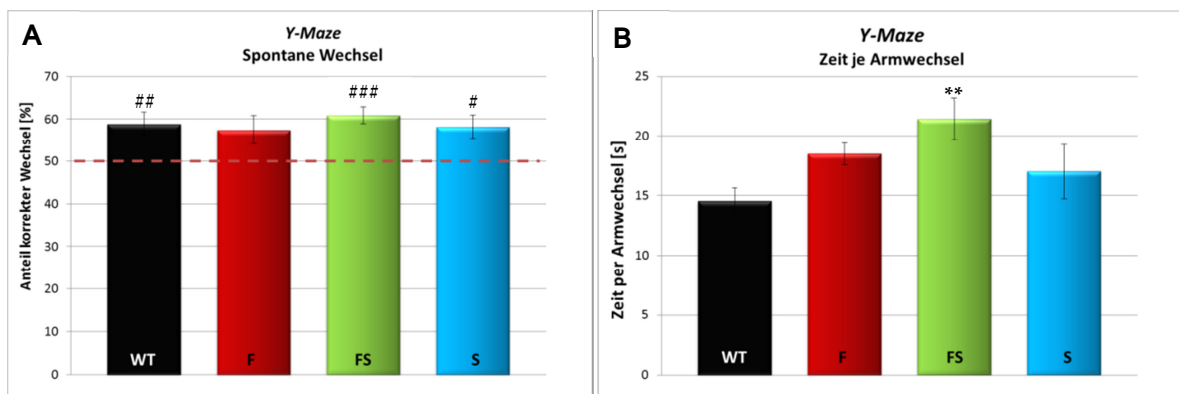


**Abbildung 3-14.** *Y-Maze*-Areal mit Markierung der drei Arme A, B, und C und des Zentrums, sowie Angabe der Entfernungen. Im *Y-Maze*-Versuch wird das Arbeitsgedächtnis untersucht.

Arm betreten hat und wieder ins Zentrum zurückgekehrt ist, wird sie wiederum in einen der Arme eintreten. Bei einem funktionierenden Arbeitsgedächtnis erwartet man, dass die Maus sich als nächstes eher für den Arm entscheidet, dessen Inspektion am längsten zurück liegt. Wählt die Maus hingegen rein zufällig zwischen beiden Armen aus, betrüge die Auswahlwahrscheinlichkeit für jeden der beiden Arme jeweils 50 %. Wenn die Quote für die Auswahl des korrekten Armes (Korrekttheitsquote) über 50 % liegt, bezeugt dies ein funktionierendes Arbeitsgedächtnis (Wahlsten 2001). Zusätzlich zur Bestimmung der Korrekttheitsquote für die untersuchten Genotypen wurde auch die durchschnittliche Zeitspanne je Armwechsel bestimmt und zwischen den Genotypen verglichen.

In unserer Untersuchung erzielten die Mäuse aller Genotypen Korrekttheitsquoten oberhalb von 50 %, wengleich die F-Mäuse minimal schlechter abschneiden und sehr knapp die rechnerische Signifikanzgrenze verfehlen (WT: 59 %, F: 57 %, FS: 61 %, S: 58 %; Abbildung 3-15, A). Die Mäuse unterschiedlichen Genotyps unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, sodass bei dieser Untersuchung für die FMRP-defizienten Tiere kein spezifischer Phänotyp ausgemacht werden kann und keine Kompensation durch die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels möglich ist.

F-Mäuse zeigen einen Trend zu einer längeren durchschnittlichen Zeitspanne je Armwechsel und somit einer geringeren Armwechselfrequenz. Dies ist bei Mäusen mit der zusätzlichen Inaktivierung eines *Shank1*-Allels (FS) noch stärker ausgeprägt und stellt einen signifikanten Unterschied zu Wildtyp-Mäusen dar (WT: 14 s, F: 18 s, FS: 21 s, S: 17 s; Abbildung 3-15, B). Demnach wird hier keine Kompensation durch die zusätzliche *Shank1*-Inaktivierung erzeugt, sondern eine Verstärkung des Phänotyps. Bei Mäusen mit der alleinigen Inaktivierung eines *Shank1*-Allels (S) ist die durchschnittliche Zeitspanne je Armwechsel ebenfalls leicht, aber nicht signifikant erhöht im Vergleich zu WT-Tieren.



**Abbildung 3-15. Ergebnisse des Y-Maze-Versuchs. [A] Prozentualer Anteil korrekter Wechsel (Korrektheitsquote), Mittelwerte mit Standardfehler. Signifikanzangaben im Vergleich zum Zufallswert von 50 %, markiert durch gestrichelte Linie. Alle Genotypen erzielen eine Korrektheitsquote oberhalb von 50 %, was ein funktionierendes Arbeitsgedächtnis belegt, die F-Mäuse verfehlen allerdings knapp die Signifikanzgrenze (N = 14 (WT), 14 (F), 14 (FS), 13 (S). T-Test,  $p = 0,007$  (WT),  $0,053$  (F),  $<0,001$  (FS),  $0,014$  (S); markiert durch Doppelkreuze. [B] Zeit je Armeintritt, Mittelwerte mit Standardfehler. F-Mäuse zeigen einen Trend zu langsameren Armwechsel, was bei FS-Mäusen noch stärker ausgeprägt ist und einen signifikanten Unterschied zu Wildtyp-Mäuse darstellt (N = 14 (WT), 14 (F), 14 (FS), 13 (S). ANOVA, WT zu FS:  $p = 0,004$  (markiert durch Sternchen); WT zu F:  $p = 0,089$ .**

### 3.10 ELEVATED PLUS MAZE

Das *Elevated Plus Maze* ist ein vierarmiges Areal, wobei zwei mit Seitenwänden versehen sind (geschlossene Arme) und zwei Arme keine Seitenwände haben (offene Arme, Abbildung 3-16). Die Maus wird zu Beginn des Versuchs in das Zentrum gesetzt und darf sich dann für 5 Minuten frei im Areal bewegen. Ihr Weg wird aufgezeichnet und die Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Arme analysiert, wobei ein Armeintritt definiert wird als Überschreiten des Körpermitelpunktes der Maus über die imaginäre Grenze zwischen Zentrum und Arm. Da Mäuse freie Flächen meiden und sich präferentiell in Nähe zu einer Wand aufhalten, erwartet man häufiger Eintritte in geschlossene Arme. Je nach ihrer Ängstlichkeit erkunden die Mäuse auch die offenen Arme in einem entsprechenden Ausmaß (Rodgers & Dalvi 1997).

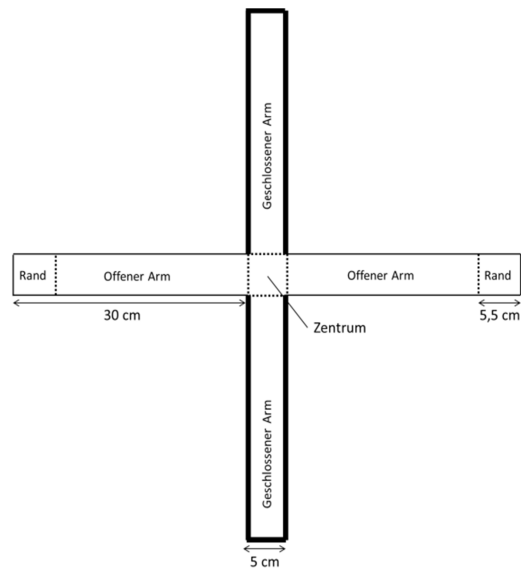


Abbildung 3-16. *Elevated Plus Maze*-Areal mit Angabe der verschiedenen Bereiche und Entfernungen. Mit dem *Elevated Plus Maze*-Test wird die Ängstlichkeit untersucht.

Bei allen untersuchten Knockout-Mäusen wurden im Untersuchungszeitraum von 5 Minuten durchschnittlich weniger Armeintritte absolviert als bei Wildtyp-Mäusen (WT: 17; F: 13,6; FS: 12,7; S: 14,6; Abbildung 3-17, A), was die bereits im *Open Field*-Versuch beobachtete ge-

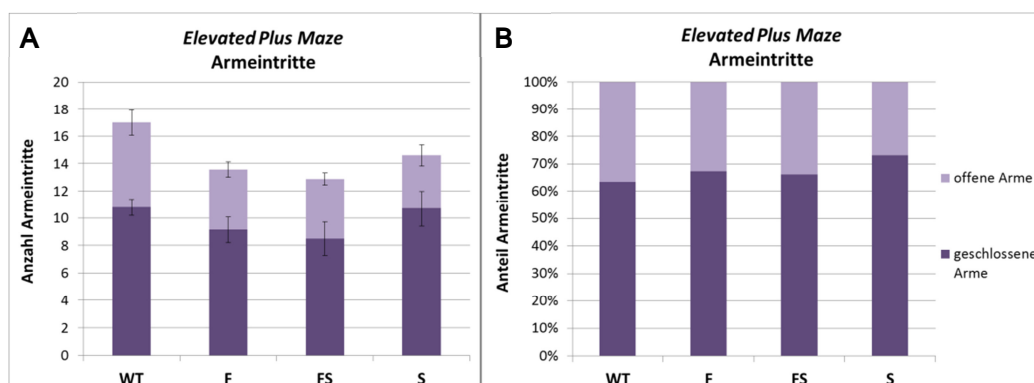


Abbildung 3-17. Armeintritte beim *Elevated Plus Maze*. [A] Anzahl der Armeintritte insgesamt und mit Anteil der offenen und geschlossenen Arme hieran; Mittelwerte mit Standardabweichung. [B] Anteil der Eintritte in offene und geschlossene Arme an der Gesamtanzahl an Eintritten; Mittelwerte. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (N = 14 (WT), 14 (F), 14 (FS), 13 (S)).

ringere Aktivität der Knockout-Mäuse bestätigt. Der prozentuale Anteil an Eintritten in offene Arme ist jedoch zwischen allen Genotypen ausgeglichen (Abbildung 3-17, B). Auch in Bezug auf die zurückgelegte Strecke (Abbildung 3-18) und die in dem jeweiligen Bereich verbrachte Zeit (Daten nicht dargestellt) gibt es zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede, weder bei absoluten noch anteiligen Werten. Daher kann man keine erhöhte Ängstlichkeit bei FMRP-defizienten Mäusen vermuten, auch die Inaktivierung eines *Shank1*-Allels alleine oder in Kombination mit dem *Fmr1*-Knockout hat hierauf keinen Einfluss.

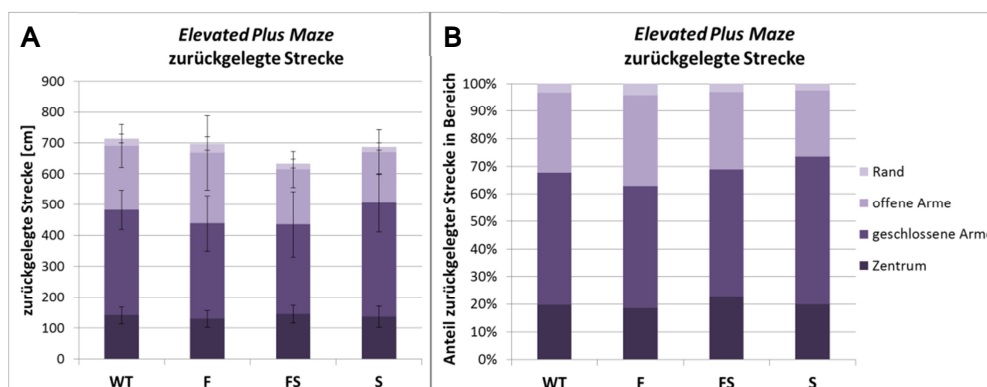


Abbildung 3-18. Zurückgelegte Strecke beim *Elevated Plus Maze*. [A] Zurückgelegte Strecke insgesamt und mit Anteil der verschiedenen Bereiche; Mittelwerte mit Standardfehler. [B] Anteil der zurückgelegten Strecke in den verschiedenen Bereichen an der Gesamtstrecke; Mittelwerte. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (n = 14 (WT), 14 (F), 14 (FS), 13 (S)).

### 3.11 SOCIAL INTERACTION

Beim sogenannten *Social Interaction*-Test verwendet man ein quadratisches Areal, welches durch eine Wand halbiert wird (Abbildung 3-19). Mittig in der Trennwand befindet sich ein Durchgang, welchen die Maus frei passieren kann. In jeder Hälfte befindet sich in einer Ecke ein perforiertes, durchsichtiges Becherglas, sodass die Hälften spiegelsymmetrisch zueinander aufgebaut sind. Der Test erstreckt sich über zwei Tage: am ersten Tag befindet sich in einem der beiden Bechergläser ein Weibchen, das andere ist leer. Eine

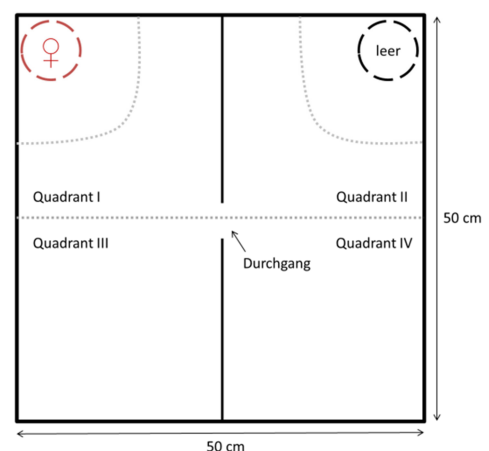


Abbildung 3-19. *Social Interaction*-Areal mit Angabe der Bereiche und Entfernungen, hiermit werden Sozialverhalten und räumliches Lernen untersucht.

männliche Maus erkundet nun für 20 Minuten das Areal, und man erwartet, dass sie sich bevorzugt in der Nähe des Weibchens aufhält. Am zweiten Tag wird das Männchen erneut in dasselbe Versuchsareal gesetzt und darf es wieder für 20 Minuten erkunden – nun jedoch sind beide Bechergläser leer. Wenn sich das Männchen an die Erfahrungen des vorherigen Tages erinnern kann und ein normales Sozialverhalten hat, bevorzugt es den Quadranten, in welchem sich am Vortag das Weibchen befand.

Alle untersuchten Knockout-Mäuse verbringen am ersten Tag signifikant mehr Zeit am Becherglas des Weibchens als die Wildtyp-Mäuse (WT: 340 s; F: 495 s; FS: 472 s; S: 432 s; Abbildung 3-20, A). Beim Vergleich zwischen dem sogenannten Weibchen-Becher und dem leeren

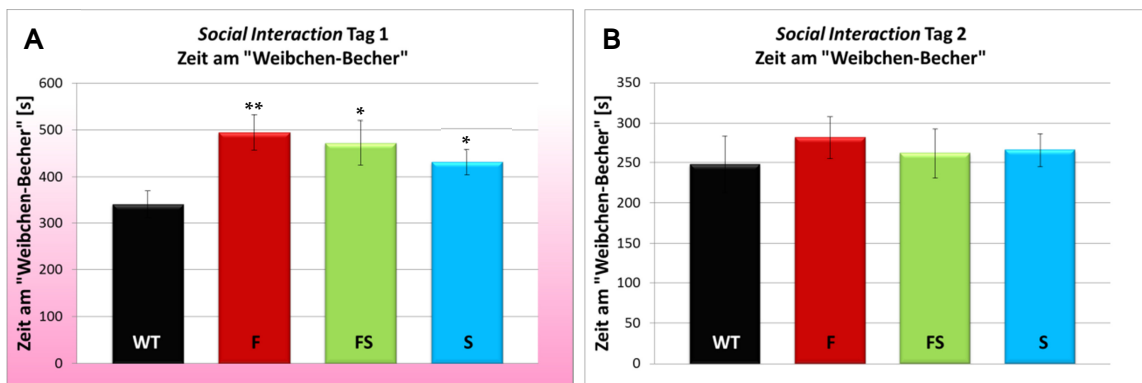


Abbildung 3-20. *Social Interaction*: verbrachte Zeitspanne am Becherglas des Weibchens. Mittelwerte mit Standardfehler, n = 14 (WT), 14 (F), 14 (FS), 13 (S). [A] Tag 1. T-Test im Vergleich zu WT: p = 0,005 (F); p = 0,033 (FS); p = 0,039 (S). [B] Tag 2. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen.

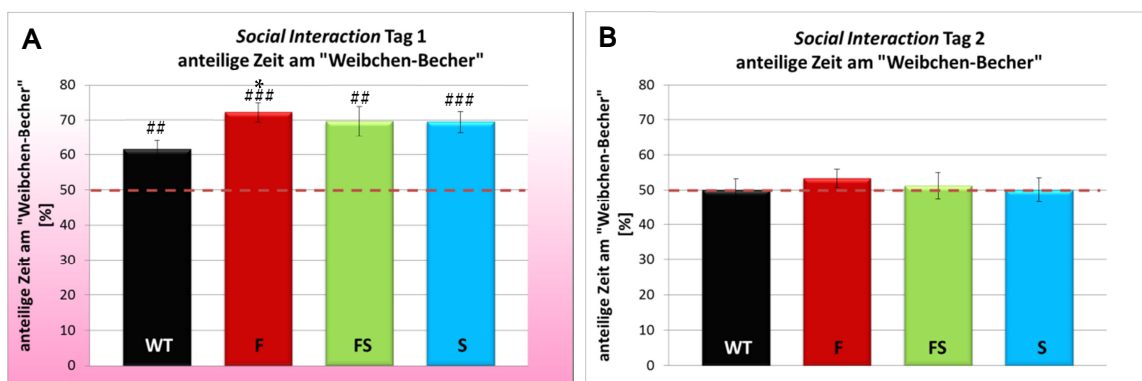


Abbildung 3-21. *Social Interaction*: anteilig verbrachte Zeitspanne am Becherglas des Weibchens im Vergleich zum leeren Becherglas. Mittelwerte mit Standardfehler, n = 14 (WT), 14 (F), 14 (FS), 13 (S). Sich durch Zufall ergebende Korrektheitsquote von 50 % ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. [A] Tag 1. T-Test zwischen WT und F: p = 0,011; markiert durch Sternchen. T-Test für Vergleich zum Zufallswert von 50 %: p = 0,001 (WT); <0,001 (F); 0,001 (FS); <0,001 (S); markiert durch Doppelkreuze. [B] Tag 2. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen.

Becher zeigt sich bei allen Genotypen eine signifikante Präferenz für den Becher mit dem Weibchen: von der insgesamt an beiden Bechern verbrachten Zeit hielten sich die Wildtyp-Mäusen in 61,4 % der Zeit am Weibchen-Becher auf und die Knockout-Mäuse bevorzugten den Weibchen-Becher sogar in einem größeren Ausmaß (F: 61,4 %; FS: 69,6 %; S: 69,4 %; Abbildung 3-21, A). Der Unterschied zwischen WT- und F-Mäusen ist signifikant.

In den Ergebnissen des zweiten Testtages unterscheiden sich die Genotypen nicht voneinander. Hierbei fällt auf, dass bei keinem Genotyp eine Bevorzugung des sogenannten Weibchen-Bechers zu beobachten ist (WT: 50 %; F: 53,4 %; FS: 51,2 %; S: 50 %, Abbildung 3-21, B). Dies entspricht nicht dem für Wildtyp-Mäuse typischen Versuchsergebnis. Der Versuch muss daher kritisch betrachtet werden, und es können lediglich aus den Ergebnissen des ersten Versuchstages Rückschlüsse auf das Sozialverhalten gezogen werden.

Die Analyse der Laufstrecke beim *Social Interaction*-Test (Abbildung 3-22) liefert an beiden Tagen ein sehr ähnliches Bild wie der *Open Field*-Test. Auch beim *Social Interaction* -Test legen die Wildtyp-Mäuse eine signifikant längere Strecke zurück als die Knockout-Mäuse. Dabei legen die FS-Mäuse die geringste Strecke zurück, F- und S-Mäuse liegen mit ihren Werten dazwischen (zurückgelegte Strecke Tag 1: WT: 6043 cm; F: 5413 cm; FS: 5014 cm; S: 5681 cm).

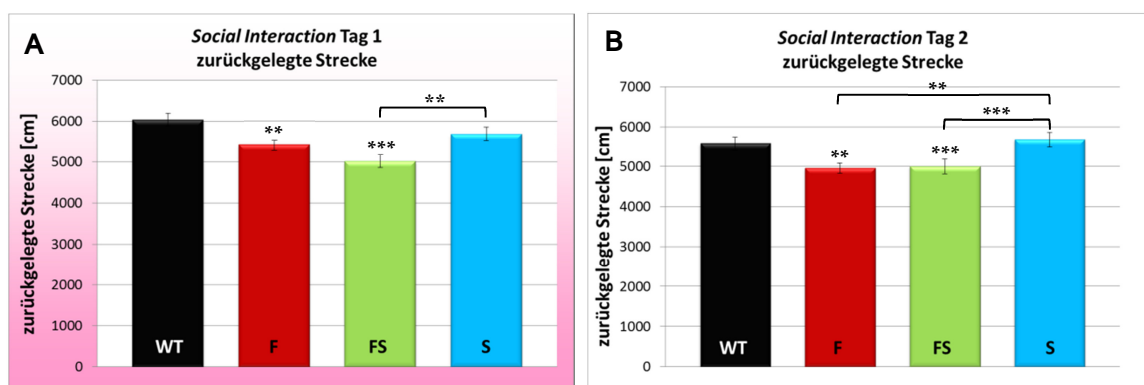
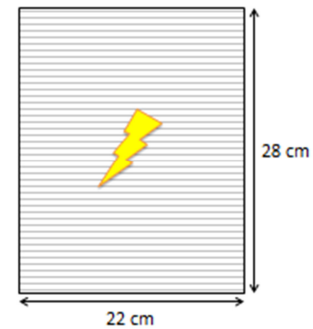


Abbildung 3-22. Zurückgelegte Strecke beim *Social Interaction*-Test. Mittelwerte mit Standardfehler, n = 14 (WT), 14 (F), 14 (FS), 13 (S). [A] Tag 1. ANOVA, Vergleich zu WT: p = 0,007 (F); <0,001 (FS); FS zu S: p = 0,006; markiert durch Sternchen. [B] Tag 2. ANOVA, Vergleich zu WT: p = 0,001 (F); <0,001 (FS); F zu S: p = 0,006; FS zu S: p < 0,001; markiert durch Sternchen.

### 3.12 FEAR CONDITIONING

Beim *Fear Conditioning* befindet sich die Maus in einem rechteckigen Areal, dessen Boden aus einem Metallgitter besteht, das unter Strom gesetzt werden kann (Abbildung 3-23). Die Maus erfährt nach einer zweiminütigen Habituationszeit einen Stromschlag. Wenn die Maus später erneut in das Areal gesetzt wird, erwartet man, dass sie sich an die unangenehme Erfahrung erinnert und ängstlich reagiert. Dies äußert sich durch ein Verharren in Bewegungslosigkeit (*Freezing*). Die Maus wird daher 24 Stunden später (Tag 2) erneut in



**Abbildung 3-23. *Fear Conditioning*-Areal mit Angabe der Entfernungen. Beim *Fear Conditioning* wird Lernen und Gedächtnis untersucht.**

das Areal gesetzt – ohne dass ein Stromschlag erfolgt – und die *Freezing*-Zeit wird über eine Dauer von 28 Minuten erfasst. Dabei wird pro Minute der Anteil der Zeit bestimmt, den die Maus in Bewegungslosigkeit verbringt. Man erwartet einen stark erhöhten *Freezing*-Anteil zu Beginn des zweiten Tages im Vergleich zur Habituationsphase an Tag 1, welcher im Verlauf der 28 Minuten absinkt. Wenn die Maus 48 Stunden später (Tag 3) noch einmal in das Areal gesetzt wird, erfolgt eine Erfassung der *Freezing*-Zeit über eine Dauer von 4 Minuten. Hier erwartet man einen *Freezing*-Anteil, der anfänglich leicht höher liegt als der letzte Wert von Tag 2 und dann im Verlauf der 4 Minuten weiter absinkt (Kim & Jung 2006, Rudy *et al.* 2004).

In der Habituationsphase am ersten Tag kann für die FMRP-defizienten Mäuse ein geringer *Freezing*-Anteil von unter 1 % ausgemacht werden, die anderen Genotypen zeigen kein *Freezing* (Abbildung 3-24, A); während also Wildtyp-Mäuse in dieser Situation keinerlei *Freezing*-Verhalten zeigen, tritt dies bei FMRP-defizienten Mäusen minimal auf. An Tag 2 zeigen alle Genotypen entsprechend den Erwartungen erhöhte *Freezing*-Werte (Abbildung 3-24, B). Die FMRP-defizienten Mäuse mit und ohne zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels verbringen dabei mehr Zeit in Bewegungslosigkeit als die Wildtyp-Mäuse und die S-Mäuse. Erwartungsgemäß nimmt der *Freezing*-Anteil bei allen Genotypen im Laufe der Zeit ab, da durch das Ausbleiben eines Stromschlages eine Extinktion eintritt. Dies sollte an Tag 3 an einem im Vergleich zum Endwert von Tag 2 zunächst wieder leicht höheren, dann aber sich wieder verringernenden *Freezing*-Anteil sichtbar sein. Dies tritt an Tag 3 bei den analysierten WT-Mäusen im Unterschied zu den Knockout-Mäusen jedoch nicht im erwarteten Ausmaß

ein (Abbildung 3-24, C). Wenn man für jede Maus den mittleren *Freezing*-Anteil von Tag 2 Minute 1-4 auf 100 % setzt, ist die relative Reduktion des *Freezings* im weiteren Verlauf von Tag 2 und an Tag 3 besser zu beobachten (Abbildung 3-25). Während an Tag 2 bei allen Genotypen eine Reduktion der *Freezing*-Zeit auf 50-60 % stattfindet, fällt an Tag 3 eine unerwartete Steigerung bei den Wildtyp-Mäusen auf (Tag 3, WT: 92,9 %; F: 69,7 %; FS: 58,6 %; S: 52,0 %). Die FMRP-defizienten Mäuse zeigen insbesondere im *Freezing*-Verhalten an Tag 2 einen sich von den Wildtyp-Mäusen unterscheidenden Phänotyp, der aber nicht durch die zusätzliche heterozygote *Shank1*-Inaktivierung kompensiert wird. Die Mäuse mit der alleinigen heterozygoten *Shank1*-Inaktivierung zeigen an Tag 2 ein den Wildtyp-Mäusen ähnliches *Freezing*-Verhalten, jedoch nicht den unüblichen Anstieg an Tag 3.

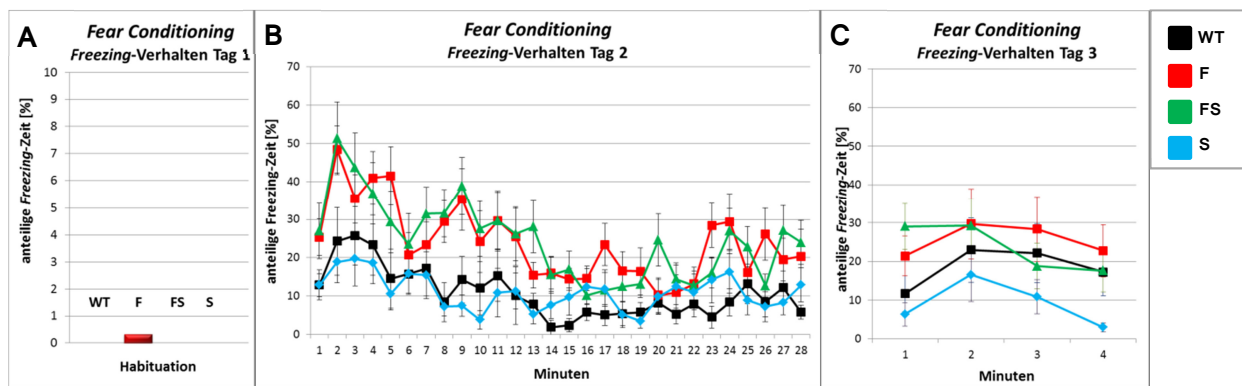


Abbildung 3-24. *Fear Conditioning*. Darstellung des prozentualen Anteils von in Bewegungslosigkeit verbrachter Zeit pro Minute. Mittelwerte mit Standardfehler, n = 14 (WT), 14 (F), 14 (FS), 13 (S). [A] Tag 1. [B] Tag 2. ANOVA des durchschnittlichen *Freezing*-Wertes, WT zu F: p = 0,005; WT zu FS: p = 0,002; F zu S: p = 0,007; FS zu S: p = 0,003 [C] Tag 3.

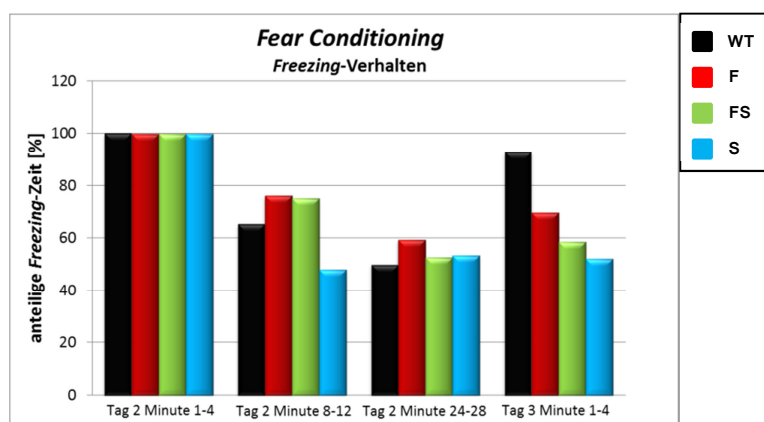
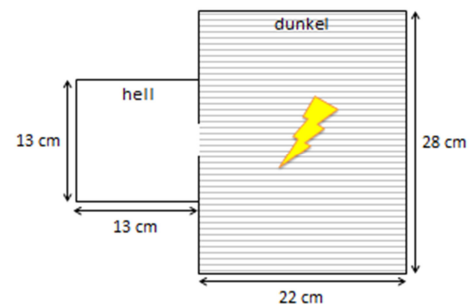


Abbildung 3-25. *Fear Conditioning*. Mittelwerte, n = 14 (WT), 14 (F), 14 (FS), 13 (S). Die mittleren *Freezing*-Anteile von Tag 2 Minute 1-4 sind als 100% definiert. Die mittleren *Freezing*-Anteile von jeweils 4 Minuten zu Mitte und Ende des Untersuchungszeitraums an Tag 2 und des Untersuchungszeitraums an Tag 3 sind relativ dazu angegeben. Die Steigerung des *Freezing*-Anteils an Tag 3 bei den Wildtyp-Mäusen ist untypisch.



### 3.13 INHIBITORY AVOIDANCE EXTINCTION

Bei diesem Versuch gibt es ein helles und ein dunkles Kompartiment, welche über einen Durchgang miteinander verbunden sind (Abbildung 3-26). Die Maus wird zu Versuchsbeginn in das helle Kompartiment gesetzt, und da Mäuse dunkle Bereiche den hellen vorziehen, wird erwartet, dass sie in das dunkle herüberwechseln wird. In diesem Versuch wird die Zeit gemessen, die die Maus im hellen Areal verbleibt, bevor sie in das dunkle Kompartiment wechselt. Sobald die Maus am ersten Tag in das dunkle Kompartiment übergetreten ist, erfährt sie dort über ein Metallgitter am Boden einen Stromschlag und wird 20 Sekunden später herausgenommen. In einem Abstand von 6, 24 und 48 Stunden wird erneut die Latenzzeit gemessen, und nun erfährt die Maus im dunklen Kompartiment keinen Stromstoß, sondern verbleibt für 2 Minuten dort bevor sie herausgenommen wird. Dadurch findet eine Extinktion des zuvor Gelernten statt. Entsprechend des Lernerfolges erwartet man eine höhere Latenzzeit nach 6 Stunden gegenüber der Latenzzeit zum Zeitpunkt 0 Stunden, und entsprechend des Extinktionserfolges eine sich wiederum reduzierende Latenzzeit nach 24 und 48 Stunden gegenüber des 6-Stunden-Wertes (Thomas *et al.* 2011a, Dölen *et al.* 2007, Thomas *et al.* 2011b, Rudy *et al.* 2004).



**Abbildung 3-26. Inhibitory Avoidance Extinction-Areal mit Angabe der verschiedenen Bereiche und der Entfernungen. Im Inhibitory Avoidance Extinction-Test wird das Lern- und Extinktionsvermögen untersucht.**

Bei Betrachtung der Latenzzeiten der Zeitpunkte 0 und 6 Stunden fällt auf, dass alle Genotypen zum Zeitpunkt 6 Stunden deutlich höhere Latenzzeiten aufweisen (Abbildung 3-27, A und B). Daher kann man eine sehr gute Lern- bzw. Gedächtnisleistung für alle Genotypen konstatieren. Dabei fällt auf, dass zum Zeitpunkt 6 Stunden alle Knockout-Mäuse leicht höhere Latenzzeiten gegenüber den Wildtyp-Tieren aufweisen. Den Erfolg der zu diesem Zeitpunkt erstmalig stattfindenden Extinktion des zuvor Gelernten kann man nach 24 Stunden überprüfen. Alle Genotypen mit Ausnahme von FB zeigen hier die erwartete Reduktion der Latenzzeit (Abbildung 3-27, C). Die FB-Mäuse fallen durch eine unverändert hohe Latenzzeit auf. Allerdings bleibt festzuhalten, dass der Stichprobenumfang mit nur 4 Mäusen auch deutlich geringer als bei den übrigen Genotypen ist. Die analysierten Wildtyp-Mäuse ver-

zeichnen auch hier eine geringere Latenzzeit als die Knockout-Mäuse. Durch die zweite Ex-tinktionsmaßnahme werden zum Zeitpunkt 48 Stunden weiter verringerte Latenzzeiten erzielt (Abbildung 3-27). Dabei bleiben die Knockout- erneut bei einem etwas höheren Wert als die Wildtyp-Mäuse. Die Extinktion des zuvor Gelernten scheint bei den Knockout-Mäusen weniger erfolgreich zu sein.

Wenn man den 0-Stunden-Wert für jede Maus als sogenannten Basiswert berücksichtigt, zeigt sich in der statistischen Analyse (Überlebenszeitanalyse, Frailty-Modell) unter Betrachtung der Genotypen WT, F, FS, S und aller Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen WT- und F-Mäusen. Eine Analyse ohne Basiswert ergibt nicht nur einen signifikanten Unterschied zwischen WT- und F-Mäusen, sondern auch zwischen WT- und FS-, sowie WT- und S-Mäusen. F- und FS-Mäuse unterscheiden sich bei beiden Berechnungswegen nicht signifi-kant voneinander, die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels scheint weder auf das Lernvermögen noch auf die Modifikation gelernten Wissens einen Einfluss zu haben.

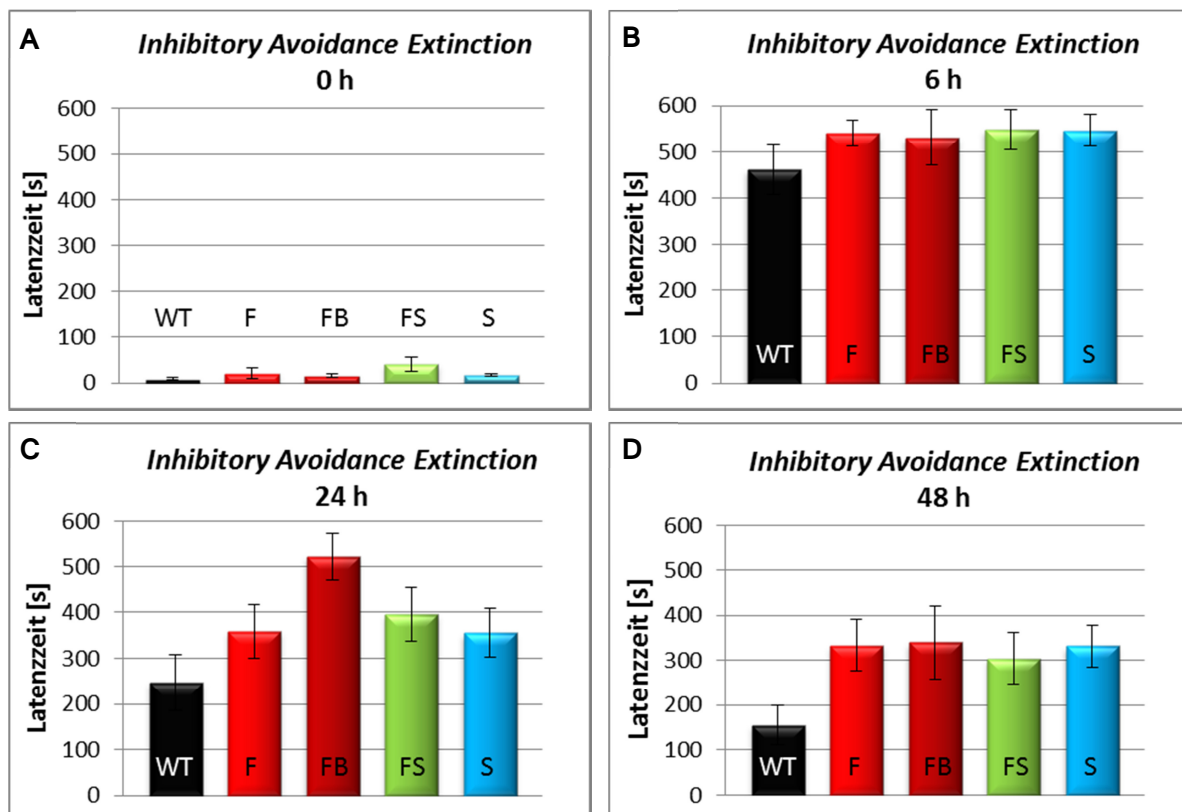


Abbildung 3-27. *Inhibitory Avoidance Extinction*. Wildtyp-Mäuse zeigen durchweg kürzere Latenzzeiten als die untersuchten Knockout-Mäuse. Mittelwerte mit Standardfehler,  $n = 13$  (WT), 13 (F), 4 (FB), 13 (FS), 13 (S). Statistische Auswertung von WT, F, FS, S mit Überlebenszeitanalyse (Frailty-Modell) unter Verwendung des 0 Stunden-Wertes je Maus als Basiswert: WT zu F signifikant verschieden. Ohne Verwendung eines Basiswertes: WT zu F, FS und S signifikant verschieden. [A] Zeitpunkt 0 Stunden. [B] Zeitpunkt 6 Stunden. [C] Zeitpunkt 24 Stunden. [D] Zeitpunkt 48 Stunden.

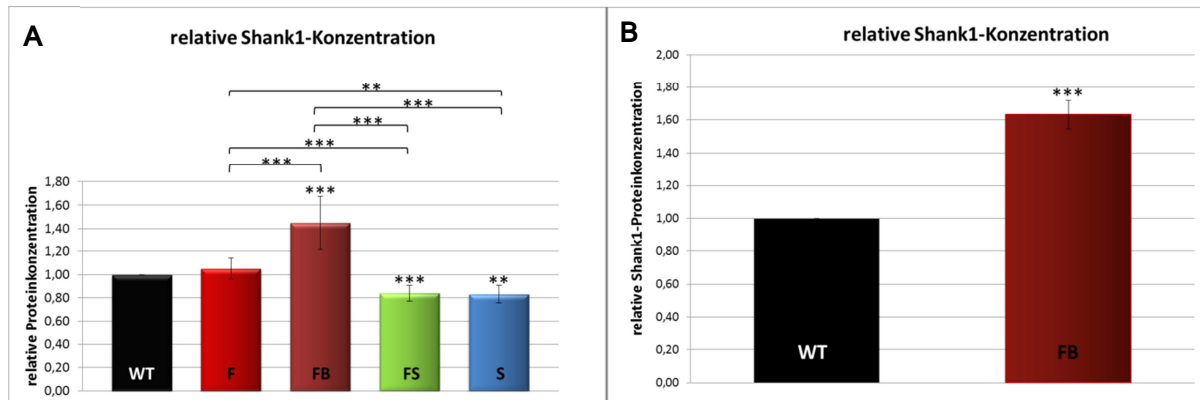
Der Unterschied zwischen Wildtyp-Mäusen und FMRP-defizienten Mäusen kann in diesem Experiment nicht durch die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels kompensiert werden. Die Mäuse mit der alleinigen Inaktivierung eines *Shank1*-Allels zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie die FMRP-defizienten Mäuse. Es wäre durchaus denkbar, dass es beim kombinierten Knockout (FS) zu einer Potenzierung käme, doch stattdessen liegen alle Genotypen in etwa auf einem Niveau.

### 3.14 QUANTITATIVE ANALYSE VON SHANK1 IN ALLEN GENOTYPEN

Um die Shank1-Proteinkonzentration von allen verwendeten Genotypen vergleichen zu können, wurden parallel zu den Verhaltensexperimenten 3-4 unabhängige PSD-Präparationen des Vorderhirns von jeweils 3-4 Mäusen je Genotyp im Alter von 12-16 Wochen durchgeführt. Die PSD-Fraktionen wurden in Western-Blot-Analysen eingesetzt, wobei die Shank1-Proteinkonzentration über spezifische Antikörper ermittelt wurde.

Hierbei konnten wir die für die Ursprungslinie (FB) eine relative Shank1-Konzentration von 145 % des Wildtyp-Niveaus finden und somit die zuvor publizierte signifikante Erhöhung der Shank1-Konzentration nachvollziehen (Schütt *et al.* 2009). Jedoch lag überraschenderweise diese Erhöhung in den FMRP-defizienten Mäusen unserer neuen Linie (F) nicht vor, die F-Mäuse wiesen mit 105 % des Wildtyp-Niveaus eine unveränderte Shank1-Konzentration in der PSD auf. Sowohl bei den FS-Mäusen als auch bei den S-Mäusen lag eine gegenüber Wildtypen niedrigere Shank1-Konzentration vor, wie es durch die Inaktivierung eines *Shank1*-Allels in diesen Tieren auch zu erwarten ist (FS: 84 %; S: 83 %; (Abbildung 3-28, A). Der Vergleich von F- und FS-Mäusen zeigt bei FS-Mäusen eine Reduktion der postsynaptischen Shank1-Konzentration auf 80 % des Niveaus der F-Tiere.

Um die Erhöhung der Shank1-Konzentration bei FB-Mäusen zusätzlich in einem anderen System zu verifizieren, wurden kultivierte Cortexneurone von Wildtyp- und *Fmr1*-Knockout-Mäusen der ursprünglichen Linie (FB) untersucht. Auch hier konnte mit 163 % des Wildtyp-Niveaus eine signifikante Erhöhung der Shank1-Konzentration bei FMRP-Defizienz gefunden und die ursprüngliche Annahme für die FB-Mäuse bestätigt werden (Abbildung 3-28, B).



**Abbildung 3-28. Quantitative Bestimmung von Shank1. [A] Shank1 in der PSD. Darstellung der Mittelwerte der Mittelwerte von 3 (WT) bzw. 4 (F, FB, FS) bzw. 2 (S) unabhängigen Präparationen des Vorderhirns von jeweils 3-4 Mäusen und Bestimmung der relativen Shank1-Konzentration in den PSD-Fractionen durch mindestens 7 Western Blot-Analysen je Präparation. Statistische Analyse mit einem hierarchisch strukturierten linearen gemischten Modell, WT zu FB und FS:  $p < 0,001$ ; WT zu S:  $p = 0,004$ ; F zu FB und FS:  $p < 0,001$ ; F zu S:  $p = 0,013$ ; FB zu FS und S:  $p < 0,001$ . [B] Shank1 in kultivierten Cortexneuronen der Maus. Darstellung der Mittelwerte von 2 unabhängigen Präparationen und Bestimmung der relativen Shank1-Konzentration im Rohlysate durch 4 bzw. 9 Western Blot-Analysen je Präparation. Statistische Analyse mit einem hierarchisch strukturierten gemischten Modell,  $p < 0,001$ .**

## 4 DISKUSSION

Das Fehlen des Proteins FMRP führt beim Menschen zu einem charakteristischen Krankheitsbild, welches unter der Bezeichnung Fragiles X-Syndrom zusammengefasst wird. Betroffene zeigen u. a. faziale Auffälligkeiten, juveniles Übergewicht, gegebenenfalls Makroorchidismus, eine Neigung zu Krampfanfällen sowie eine unterschiedlich stark ausgeprägte mentale Retardierung (De Arce & Kearns 1984, Bhakar *et al.* 2012). In Neuronen des Gehirns wird FMRP eine regulatorische Funktion bei der lokalen Translation im Dendriten zugesprochen. In Abwesenheit von FMRP wurde u. a. das Protein Shank1 in postsynaptischen Bereichen in einer erhöhten Konzentration gefunden (Schütt *et al.* 2009). In vivo interagiert FMRP mit der Shank1-mRNA (Schütt *et al.* 2009, Darnell *et al.* 2011) und reprimiert vermutlich ihre Translation. Shank1 kommt als einem der Hauptgerüstproteine des postsynaptischen Proteinnetzwerks eine wesentliche Rolle für Form und Funktion der Postsynapse zu (Boeckers *et al.* 2002). Um die Rolle einer erhöhten Shank1-Konzentration für die Pathologie des Fragilen X-Syndroms zu untersuchen, habe ich im Rahmen meiner Promotion gentechnisch veränderte Mäuse erzeugt, welche FMRP-defizient sind und nur ein funktionsfähiges *Shank1*-Allel besitzen. Dadurch wird die *Shank1*-Gendosis der Mäuse halbiert. Auf diese Weise soll die durch FMRP-Abwesenheit hervorgerufene Erhöhung der Shank1-Konzentration kompensiert werden. Im weiteren Verlauf wurde durch Analysen der Dornendichte und -morphologie sowie des Verhaltens der Mäuse untersucht, ob diese molekulare Kompensation zu einer Normalisierung des FXS-Phänotyps beitragen kann und eine Regulation des postsynaptischen, aktiven Shank1 somit einen möglicher Therapieansatz bei FXS darstellt.

In den Analysen wurden *Fmr1*<sup>(-/-)</sup>*Shank1*<sup>(+/+)</sup>- und *Fmr1*<sup>(-/-)</sup>*Shank1*<sup>(+/-)</sup>-Geschwistertiere (F bzw. FS) verglichen. Diese Mäuse entstanden aus mehreren Verpaarungen von *Fmr1*<sup>(-/-)</sup>*Shank1*<sup>(+/+)</sup>-Weibchen unserer schon länger bestehenden *Fmr1*-Knockout-Linie B6.129P2 (FB) mit *Fmr1*<sup>(+/-)</sup>*Shank1*<sup>(+/-)</sup>-Männchen (S) aus der *Shank1*-Knockout-Linie. Die F- und FS-Tiere wurden in allen Fällen mit männlichen Wildtyp-Mäusen desselben genetischen Hintergrundes (C57BL/6J) aus einer separaten Zuchtlinie (WT) verglichen. Teilweise erfolgte auch ein Vergleich mit männlichen S- und FB-Mäusen.

In früheren Untersuchungen der FB-Mäuse wurde eine signifikante Erhöhung der postsynaptischen Shank1-Konzentration im Vergleich zu WT-Tieren gefunden (Schütt *et al.* 2009). Dies konnte auch in der aktuellen Arbeit reproduziert werden. Jedoch konnte der Anstieg der postsynaptischen Shank1-Konzentration für die aus der Verpaarung mit einem S-Männchen neu generierten F-Mäuse nicht gezeigt werden. Da alle Mäuse in derselben Tierhaltungsbarriere gehalten wurden, gab es keine Unterschiede in der Aufzucht. Somit ist eine genetische Ursache für die voneinander abweichenden Ergebnisse der postsynaptischen Shank1-Konzentration anzunehmen. Entweder wird die Erhöhung der postsynaptischen Shank1-Konzentration in den FB-Mäusen nicht durch den FMRP-Verlust verursacht, oder in den F-Mäusen wird durch das Zusammenspiel mit anderen Genen des genetischen Hintergrundes eine Kompensation erzielt. Ersteres wäre ein vorstellbares Szenario, da in den Untersuchungen der FB-Tiere keine Wildtyp-Geschwister Tiere zum Vergleich herangezogen wurden. Zwar haben die von The Jackson Laboratories erworbenen *Fmr1*-Knockout-Mäuse (Lagernummer 003025) als genetischen Hintergrund die C57BL/6J-Linie, doch getrennt geführte Linien können sich nach einigen Generationen durch genetische Drift und Mutationen unterscheiden (Papaioannou & Festing 1980, de Brito *et al.* 2005, Taft *et al.* 2006, Casellas & Medrano 2008, Casellas 2011). The Jackson Laboratories schätzt, dass sich durch genetische Drift bereits nach 10 Generationen Veränderungen zwischen zwei Linien herausbilden können. Die C57BL/6J-Zucht des UKE wird spätestens alle 10 Generationen durch den Kauf neuer Tiere neu aufgebaut (QM-Handbuch VTH UKE) und die aktuelle Linie wurde 2010 mit Mäusen von The Jackson Laboratories gestartet. Vor 2010 wurde die C57BL/6J-Zucht mit Mäusen von Charles River betrieben. Dies ist der offizielle Vertreiber der C57BL/6J-Mäuse von The Jackson Laboratories in Europa, und nach eigenen Angaben besteht kein Unterschied zwischen den C57BL/6J-Mäusen von Charles River und denen direkt von The Jackson Laboratories. Dennoch kam es bei den C57BL/6J-Mäusen von Charles River zweimalig (2008 und 2009) zum Auftreten von Ataxien. Die direkt von The Jackson Laboratories gekauften Tiere hingegen zeigen dieses Problem nicht, sodass man dennoch in Betracht ziehen könnte, dass Unterschiede zwischen den Mäusen vorliegen. The Jackson Laboratories verwendet seit 2004 alle fünf Generationen (ungefähr alle 18 Monate) kryokonservierte Embryonen, mit denen die Zucht jeweils erneuert und auf diese Weise die genetische Drift unterbunden wird – wenigstens so lange, wie Embryonen aus derselben Verpaarung vorrätig sind (Taft *et al.* 2006). Aber auch dies garantiert nicht eine absolute genetische Stabilität der Linie, da die

kryokonservierten Embryonen kein komplett identisches Genom besitzen und dieses Verfahren auch nicht vor Veränderungen durch Mutationen schützen kann (Casellas 2011). Für männliche Mäuse wurde eine Mutationsrate pro Generation von durchschnittlich 0,9 Basenpaaren des effektiven Genoms berechnet, wobei beim effektiven Genom nur der Anteil der Gene berücksichtigt wird (Drake *et al.* 1998). Mutationen stellen somit durchaus einen ernst zu nehmenden Einfluss dar (Stevens *et al.* 2007, Drake *et al.* 1998). Im Juni 2007 erfolgte die letzte Einkreuzung von C57BL/6J-Mäusen von Charles River in die ursprüngliche *Fmr1*-Knockout-Linie (B6.129P2). Obwohl von der Versuchstierhaltung des UKE als auch von The Jackson Laboratories der höchstmögliche Aufwand betrieben wird, die Mäuse genetisch zu konservieren, sind die Wildtyp-Tiere zum jetzigen Zeitpunkt mit jenen, die 2007 bei der letztmaligen Einkreuzung verwendet wurden, natürlich nicht absolut identisch. Und da die ursprüngliche *Fmr1*-Knockout-Linie B6.129P2 bis zum Beginn der ersten Versuche 2010 für mindestens zehn Generationen separat geführt wurde, kann es zu genetischer Drift und Mutationen gekommen sein. Letztlich ist es möglich, dass sich die FB-Mäuse von den zum Vergleich aus einer separaten Linie herangezogenen Wildtyp-Mäusen in mehr als nur dem inaktivierten *Fmr1*-Gen unterscheiden. Insofern kann die beobachtete Shank1-Konzentrationserhöhung in der FB-Linie auch andere genetische Ursachen haben und muss nicht durch die Inaktivierung des *Fmr1*-Gens verursacht worden sein. Genauso können sich F-, FS- und S-Mäuse in mehr als den bekannten Mutationen von den Wildtyp-Tieren unterscheiden. Falls man also doch davon ausginge, die FMRP-Defizienz sei ursächlich für die erhöhte Shank1-Konzentration, könnte wiederum ein leicht unterschiedlicher genetischer Hintergrund der F-Mäuse eine Normalisierung dieses Phänotyps herbeigeführt haben. Dies alles bleibt Spekulation und es zeigt, wie wichtig ein Vergleich von Geschwistertieren ist, da auf diese Weise ein höchstmögliches Maß an Uniformität des genetischen Hintergrundes gewährleistet werden kann; bei einer solchen Analyse auftretende Unterschiede wären mit höherer Sicherheit alleinig auf die bekannte Mutation zurückzuführen.

In meiner Arbeit habe ich zum Vergleich von F- und FS-Mäusen Geschwistertiere eingesetzt. Diese Tiere sollten somit genetisch sehr ähnlich sein, abgesehen vom mutierten *Shank1*-Allel, sodass alle beobachteten Unterschiede zwischen den Mäusen hierin begründet sein sollten. Die untersuchten Wildtyp-Mäuse sind keine Geschwistertiere der F- und FS-Mäuse, sondern Mäuse einer separaten UKE-Zuchtlinie, die nominell einen identischen genetischen Hinter-

grund besitzt (C57BL/6J). Die S-Mäuse haben vermutlich ebenfalls einen C57BL/6J-Hintergrund und stammen aus dem Labor von Tobias Böckers (Universität Ulm) und ursprünglich aus dem Labor von Morgan Sheng (Massachusetts Institute of Technology, USA). Diese Mäuse wurden nicht am UKE mit den Mäusen der C57BL/6J-Zuchtlinie zurückgekreuzt. Die unterschiedlichen Zuchtlinien können sich trotz eines nominell identischen genetischen Hintergrunds aufgrund von Drift und Mutationen voneinander unterscheiden. Theoretisch wäre es uns möglich, zusätzlich zu den F- und FS-Mäusen auch WT- und S-Geschwistertiere zu generieren: hierfür müssten sowohl Weibchen als auch Männchen in beiden Genlozi hetero- bzw. hemizygot sein. Statistisch wären 6,25 % der Nachkommen männliche Wildtyp-, 6,25 % männliche F-, 12,5 % männliche FS- und 12,5 % männliche S-Mäuse. Um von jedem Genotyp mindestens 10 Tiere zu erhalten, müsste man rechnerisch 160 Nachkommen generieren; dies entspräche ca. 27 Würfen. Für die verhaltensbiologischen Untersuchungen sollten die Mäuse zudem ein ähnliches Alter haben, die Würfe müssten also in einem Zeitfenster von höchstens 10 Wochen geboren werden. Um auf die benötigten Tierzahlen zu kommen, wären mehrere Zuchtpärchen notwendig. Daher muss zunächst sichergestellt sein, dass alle beteiligten Linien (WT, FB, S) als Inzuchtlinien mit über 20 Generationen Bruder-Schwester-Verpaarungen vorliegen. In einer so erzeugten Inzuchtlinie sind die Mäuse, allerdings ohne Beachtung einer eventuellen genetischen Drift, statistisch zu 98,6 % genetisch gleich (Silver 1995, Green 1981). Nachkommen von zwei Inzuchtlinien (Hybride) sind genetisch als gleich zu betrachten, sofern die Verpaarungen in derselben Richtung und nicht reziprok erfolgten (Green 1966, Silver 1995). Somit könnten man von so erzeugten Hybriden, die in den *Fmr1*- bzw. *Shank1*-Genlozi hetero- bzw. hemizygot sind, mehrere Geschwistertiere für Verpaarungen einsetzen. Es wären dann nicht alle Versuchstiere untereinander tatsächlich Geschwister, aber es wäre die bestmögliche Strategie, damit die Versuchsmäuse genetisch so uniform wie möglich sind. Dies ist allerdings mit sehr hohem Zuchtaufwand verbunden, und könnte in Bezug auf den zeitlichen Rahmen, die Käfiganzahl und die finanziellen Mittel problematisch sein. In Anbetracht der besseren Vergleichbarkeit der Genotypen untereinander wäre diese Zuchtstrategie dennoch eine in Betracht zu ziehende Vorgehensweise. Für die durchgeführten Untersuchungen gilt, dass ein guter Vergleich zwischen F- und FS-Mäusen möglich ist und beim Vergleich zu WT- und S-Mäusen ein Einfluss unbekannter genetischer Faktoren in Betracht gezogen werden muss.



Die Inaktivierung eines *Shank1*-Allels führte unabhängig von der Funktionalität des *Fmr1*-Gens zu einer ähnlichen Reduktion der Shank1-Proteinmenge auf 84 % (FS) bzw. 83 % (S) des Wildtyp-Niveaus und 80 % (FS) bzw. 79 % (S) des Niveaus der F-Tiere. Obwohl die *Shank1*-Gendosis halbiert wurde, konnte eine Proteinkonzentration weit oberhalb von 50 % aufrechterhalten werden. Hierbei kann eine veränderte Regulation zu einer gesteigerten Transkriptionsrate des intakten *Shank1*-Allels, einer gesteigerten Translationsrate der *Shank1*-mRNA oder einer veränderten Abbaurrate des Proteins geführt haben, und somit eine teilweise Kompensation ermöglicht haben.

Die Analyse des juvenilen Körpergewichtes ergab bei FMRP-defizienten Mäusen eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen an Mäusen und Menschen (Consortium 1994, Raspa *et al.* 2010). Die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels verändert diesen Phänotyp nicht, die FS-Mäuse haben wie die F-Mäuse ein erhöhtes juveniles Körpergewicht. Auch die alleinige Inaktivierung eines *Shank1*-Allels verändert das Körpergewicht nicht, die S-Mäuse sind ähnlich schwer wie WT-Tiere, was in Übereinstimmung mit der Literatur ist (Silverman *et al.* 2011). Das Testesgewicht ist bei FMRP-Defizienz signifikant erhöht, was ebenfalls in Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen an Mäusen und Menschen ist (Berkovitz *et al.* 1986, Consortium 1994). Die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels beeinflusst dieses Merkmal nicht, das Hodengewicht ist bei FS-Mäusen wie auch bei den F-Mäusen signifikant erhöht gegenüber Wildtyp-Tieren. Die FMRP-defizienten Mäuse der beiden unterschiedlichen Linien unterscheiden sich leicht voneinander – die Erhöhung des Testesgewicht ist bei den F-Mäusen stärker ausgeprägt als bei den FB-Mäusen – jedoch ist der Unterschied zu Wildtyp-Mäusen in beiden Fällen signifikant. Bei S-Mäusen konnte ich keinen Unterschied des Testesgewichts im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen feststellen. Die Reduktion der postsynaptischen Shank1-Konzentration hat somit keinen Einfluss auf Testes- und Körpergewicht.

Die Untersuchung von akustisch ausgelösten Krämpfen zeigte auch bei uns die bereits mehrfach publizierte erhöhte Anfälligkeit von FMRP-defizienten Mäusen hierfür (Chen & Toth 2001, Yan *et al.* 2004, Dölen *et al.* 2007, Pacey *et al.* 2009, Thomas *et al.* 2011a, Heulens *et al.* 2012, Michalon *et al.* 2012). Dieser Phänotyp ist bemerkenswert konsistent und scheint kaum von anderen Faktoren des genetischen Hintergrundes beeinflusst zu werden. Die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels kompensiert diesen Phänotyp nicht.

Die Analyse der Dornendichte apikaler Dendriten des visuellen Cortex erbrachte unabhängig vom Genotyp Werte von ungefähr 1 Dorn/ $\mu\text{m}$  bei juvenilen und Werte um 0,7 Dornen/ $\mu\text{m}$  bei adulten Mäusen. Vergleichbare Dornendichten für Wildtyp-Mäuse wurden auch von anderen Arbeitsgruppen in früheren Untersuchungen ermittelt (Galvez & Greenough 2005, Grossman *et al.* 2006, McKinney *et al.* 2005, Hayashi *et al.* 2007). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-, F- und FS-Mäusen in beiden untersuchten Altersstufen (juvenil und adult) und in beiden untersuchten Dendritenabschnitten (proximal und distal vom Soma). Weder der Ausfall von FMRP noch die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels hat in unserer Untersuchung einen signifikanten Einfluss auf die Dichte dendritischer Dornen. Die Analyse der Dornenlänge erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und FMRP-defizienten Mäusen. Die größte Aussagekraft hat vermutlich der für jeden Dorn einzeln berechnete Quotient aus Dornenlänge und Dornenbreite. Hiermit kann eine näherungsweise Aussage über die Morphologie des Dorns getroffen werden. Filopodienförmige Dornen erzielen bei dieser Berechnung höhere Werte, pilzförmige Dornen zeichnen sich durch einen niedrigeren Quotienten aus. Die durchschnittlichen Quotienten von WT- und F-Mäusen unterscheiden sich nur in einer (juvenil/distal) der vier Untersuchungssituationen signifikant voneinander mit eher filopodienförmigen Dornen bei den F-Mäusen. In den anderen drei Situationen stellen wir hingegen keinen Unterschied zwischen WT- und F-Mäusen fest. In Publikationen und Übersichtsartikeln herrscht die Annahme vor, dass bei FMRP-Defizienz die Dornendichte erhöht ist und ein höherer Anteil filopodienförmiger Dornen beobachtet wird. Dies wurde nach histologischen *postmortem* Untersuchungen des Gehirns von drei FXS-Patienten 1985 und 1991 und drei weiteren Patienten im Jahre 2001 publiziert (Rudelli *et al.* 1985, Hinton *et al.* 1991, Wisniewski *et al.* 1991, Irwin *et al.* 2001). Nach Generierung der *Fmr1*-Knockout-Mauslinie 1994 wurde dieser Phänotyp zunächst auch im Mausmodell nachgewiesen (Comery *et al.* 1997, Irwin *et al.* 2000). Diese untereinander stimmigen Publikationen werden jedoch um Forschungsergebnisse ergänzt, welche weder Unterschiede in der Dornendichte juveniler Mäuse (Galvez & Greenough 2005, Meredith *et al.* 2007, Harlow *et al.* 2010, Cruz-Martin *et al.* 2010) noch adulter Mäuse (Irwin *et al.* 2002, Restivo *et al.* 2005, Grossman *et al.* 2006) finden. Nimchinsky *et al.* (2001) konnten in Abhängigkeit des Alters juveniler Mäuse (Tag 2 bis Tag 30) eine veränderte oder unveränderte Dornendichte feststellen. Die Datenlage zu Veränderungen in der Dornenlänge bei FMRP-Abwesenheit ist ebenfalls heterogen. Auch hier konnte Nimchinsky *et al.*

(2001) bei juvenilen Mäusen in Abhängigkeit des Alters eine erhöhte bzw. unveränderte Dornenlänge zeigen. Eine darauffolgende Untersuchung juveniler Mäuse konnte längere Dornen unter FMRP-Defizienz bestätigen (Meredith *et al.* 2007). Zwei weitere fanden keine Unterschiede (Cruz-Martin *et al.* 2010, Galvez & Greenough 2005). Bei adulten Mäusen konnte häufiger eine erhöhte Dornenlänge gefunden werden (Comery *et al.* 1997, Galvez & Greenough 2005, Grossman *et al.* 2006, Liu *et al.* 2010), doch auch hier gibt es Untersuchungen, die dies nicht feststellen konnten (Hayashi *et al.* 2007). Beim Vergleich der unterschiedlichen Publikationen ist zu beachten, dass teilweise verschiedene Gehirnbereiche zur Analyse herangezogen wurden. Bei allen der zuvor genannten Publikationen wurde immer der Cortex betrachtet, jedoch z. T. unterschiedliche Cortexareale. Hinzu kommt, dass nicht immer mit demselben genetischen Hintergrund gearbeitet wurde. Einige Arbeitsgruppen verwenden *Fmr1*-Knockout-Mäuse mit einem FVB-Hintergrund, während andere mit einem C57BL/6-Hintergrund arbeiteten. Ein Teil der Differenzen kann hierdurch erklärt werden, denn ganz allgemein sind bei der Verwendung verschiedener genetischer Hintergründe bei Knockout-Mäusen bereits mehrfach unterschiedliche Ergebnisse beobachtet worden (Lomin-ska *et al.* 2001, Sibia & Wagner 1995). Bei *Fmr1*-Knockout-Mäusen verschiedener Hintergrundlinien wurden auch speziell bei histologischen Analysen Unterschiede gefunden. Beispielsweise haben Mineur *et al.* (2002) signifikant kleinere Moosfaser-Endigungen im Hippocampus FMRP-defizienter Mäuse mit einem C57BL/6-Hintergrund gefunden, während Ivanco und Greenough (2002) die Mäuse von Mineur *et al.* über mehrere Generationen auf einen FVB-Hintergrund zurückgekreuzt haben und in ihren Analysen ein gegenteiliges Ergebnis erzielten (Mineur *et al.* 2002, Ivanco & Greenough 2002). Und wie bereits erwähnt können sich auch separat geführte Mauslinien des nominell identischen genetischen Hintergrunds aufgrund von genetischer Drift und Mutationen oder aber auch durch Variationen in der Aufzucht unterscheiden (Wahlsten 2001, Wahlsten *et al.* 2003). Das hiervon auch histologische Untersuchungen betroffen sein können, hat sich auch bereits in der Publikation von Comery *et al.* (1997) angedeutet: nach Veröffentlichung wurde festgestellt, dass ein Großteil der für die Analysen verwendeten Mäuse homozygot für ein rezessives Gen war, welches zu einer retinalen Degeneration führt und die untersuchte Morphologie der Neurone des visuellen Cortex der Mäuse beeinflusst haben könnte (Irwin *et al.* 2000). In unseren Untersuchungen der Dornenmorphologie konnten wir in drei von vier Untersuchungssituationen keine Veränderungen bei den analysierten F-Mäusen gegenüber WT-Tieren feststellen. Wenn man

für einen Vergleich unserer Daten diejenigen Publikationen heranzieht, welche ebenfalls den visuellen Cortex von C57BL/6-Mäusen untersucht haben, findet man sowohl Publikationen mit einer erhöhten (McKinney *et al.* 2005, Dölen *et al.* 2007) als auch mit einer unveränderten Dornendichte (Restivo *et al.* 2005, Grossman *et al.* 2006). Ein höherer Anteil langer Dornen wurde in mindestens einer Analyse gefunden (Grossman *et al.* 2006). Nach Betrachtung der Daten sollte überdacht werden, ob Veränderungen der Dornendichte oder -morphologie im Gehirn der Maus tatsächlich einen verlässlichen Phänotyp der FMRP-Defizienz darstellen. Diese Fragestellung wird aktuell diskutiert, so z. B. auf der Gordon Research Conference über FXS und Autismus 2012 in Boston (persönliches Gespräch mit J. Ölschläger-Schütt).

Für FS-Mäuse kann man im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zusammengenommen eher filopodienförmige Dornen ausmachen, lediglich in einer Untersuchungssituation (adult/distal) sind die Dornen der FS-Mäuse pilzförmiger. Der Vergleich zwischen F- und FS-Mäusen ist ein Vergleich unter Geschwistertieren und signifikante Unterschiede im Phänotyp der FS-Mäuse sollten auf die unterschiedliche Anzahl funktioneller *Shank1*-Allele zurückzuführen sein. In Bezug auf die Dornenmorphologie zeigen sich im Vergleich der F- und FS-Tiere filopodienförmigere dendritische Dornen bei juvenilen FS-Mäusen und in proximalen Dendritenabschnitten adulter FS-Mäuse. In distalen Dendritenabschnitten adulter Mäuse jedoch haben FS-Mäuse vermehrt pilzförmige Dornen im Vergleich zu F-Mäusen (wie auch bereits im Vergleich zu WT-Tieren). Für einen vollständigen *Shank1*-Verlust wurde publiziert, dass die dendritischen Dornen der CA1-Region des Hippocampus kleiner und schmaler sind und die Dornendichte verringert ist (Hung *et al.* 2008). Eine Überexpression von *Shank1* in kultivierten hippocampalen Rattenneuronen führte zu einer größeren Anzahl reifer dendritischer Dornen im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Sala *et al.* 2001, Sala *et al.* 2005). Dies deutet zusammengenommen darauf hin, dass *Shank1* an der Reifung dendritischer Dornen beteiligt ist. In unseren FS-Mäusen ist die *Shank1*-Proteinkonzentration lediglich auf 84 % des Wildtyp-Niveaus reduziert; entweder genügt diese Reduktion, um den beobachteten Phänotyp der vermehrt filopodienförmigen Dornen herbeizuführen, oder es ist eine Folge des Zusammenspiels mit dem *Fmr1*-Knockout. Hierbei kann die Analyse der adulten S-Maus, bei welcher zwar ein *Shank1*-Allel inaktiviert wurde, *Fmr1* jedoch intakt ist, Aufschluss geben. Die dendritischen Dornen der S-Maus haben einen vergleichbaren Quotienten aus Dornenlänge und Dornenbreite wie die FS-Mäuse. Dies deutet darauf hin, dass nicht ein Zusammenspiel

mit dem *Fmr1*-Knockout den Phänotyp verursacht, sondern die Reduktion von Shank1 die alleinige Ursache ist. Auch hier muss wieder beachtet werden, dass nur eine einzige S-Maus, die kein Geschwistertier ist, analysiert wurde. Falls in der Tat die Reduktion der Shank1-Konzentration auf 84 % genügen sollte, um den Anteil filopodienförmiger Dornen zu erhöhen, stellt sich dennoch die Frage, warum in einer Untersuchungssituation bei den FS-Mäusen im Vergleich zu WT- und F-Tieren eher pilzförmige Dornen vorlagen. Eventuell wären Kompensationsreaktionen denkbar, die im Laufe der Entwicklung einsetzen, doch es bliebe die Frage, warum ihr Effekt nur in weiter Entfernung vom Soma beobachtet wird. Letztlich ist dies nicht abschließend zu erklären und zufällige Schwankungen, die sich aus der Güte der Golgi-Cox-Färbung und der daraus bedingten Auswahl der Neurone beim Mikroskopieren ergeben, sind nicht vollkommen auszuschließen.

Seit vor 18 Jahren die *Fmr1*-Knockout-Mauslinie etabliert wurde, sind auch zahlreiche Verhaltensexperimente zur Charakterisierung der Tiere durchgeführt worden. Der genetische Hintergrund hat auch im verhaltensbiologischen Bereich einen großen Einfluss (Casellas 2011), und bei praktisch allen mit *Fmr1*-Knockout-Mäusen durchgeführten Verhaltensanalysen gibt es widersprüchliche publizierte Daten (Bernardet & Crusio 2006). Beim Vergleich von *Fmr1*-Knockout-Mäusen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen wurden signifikant verschiedene Ergebnisse in verhaltensbiologischen Tests erzielt (Spencer *et al.* 2011). Selbst Mäuse mit nominell identischem genetischen Hintergrund, deren Elterntiere aus verschiedenen separat geführten Tierhaltungen stammten, führen trotz gleicher Aufzucht und Durchführung der Analysen zu abweichenden Ergebnissen in Verhaltensuntersuchungen (Moy *et al.* 2009). Der Einfluss des genetischen Hintergrundes wird auch in der Studie von Silverman *et al.* (2011) deutlich, da bei der parallelen Untersuchung von Wildtyp-Geschwistertieren und Wildtyp-Mäusen mit nominell demselben genetischen Hintergrund, jedoch aus einer separaten Linie, teilweise unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Insofern muss auch bei den Verhaltensanalysen beim Vergleich der F- und FS-Mäuse mit WT- und S-Mäusen ein Einfluss von genetischen Faktoren, die unabhängig von den bekannten Mutationen im *Fmr1*- und *Shank1*-Gen sind, in Betracht gezogen werden.

In unseren Experimenten konnten wir eine gegenüber WT-Mäusen verringerte allgemeine Aktivität der FMRP-defizienten Mäuse im *Open Field*- und *Social Interaction*-Test direkt nachweisen und in dem *Y-Maze* und *Elevated Plus Maze* indirekt über die in einer bestimmten Zeit erfolgte Anzahl an Armeintritten. Dies steht im Widerspruch zu anderen Publikationen, in welchen eine erhöhte Aktivität für FMRP-defiziente Mäuse ermittelt wurde (Consortium 1994, Spencer *et al.* 2005, Hayashi *et al.* 2007, Dahlhaus & El-Husseini 2010, Yuskaitis *et al.* 2010, Spencer *et al.* 2011, Michalon *et al.* 2012). Auch bei betroffenen Menschen konnte teilweise eine Hyperaktivität festgestellt werden (De Arce & Kearns 1984, Brown *et al.* 1986, Bhakar *et al.* 2012). Für die *Fmr1*-Knockout-Maus finden sich aber genauso Publikationen, welche keine erhöhte Aktivität feststellen (Nielsen *et al.* 2002, Spencer *et al.* 2006, Moy *et al.* 2009, Westmark *et al.* 2011, Veeraragavan *et al.* 2011). Unsere analysierten FMRP-defizienten Mäuse zeigen in vier unterschiedlichen Versuchsumgebungen eine verringerte Aktivität im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, wodurch die Signifikanz dieses Befundes für eine generelle Verhaltensänderung unterstrichen wird. An dieser Stelle kann wieder von Bedeutung sein, dass es sich bei den Wildtyp- und FMRP-defizienten Mäusen nicht um Geschwistertiere handelt und unter Umständen genetische Unterschiede, unabhängig von der Inaktivierung von *Fmr1*, den Versuch beeinflussen. Die F- und FS-Mäuse hingegen sind Geschwistertiere, und zeigen eine ähnliche allgemeine Aktivität. Somit hat die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels in unseren Untersuchungen keinen Einfluss auf die Aktivität. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Silverman *et al.* (2011) überein. Auch bei Menschen mit einem funktionellen Ausfall eines *Shank1*-Allels wird keine Hyperaktivität beobachtet (Sato *et al.* 2012). Bei einer vollständige *Shank1*-Inaktivierung wurde hingegen bei Mäusen eine geringere allgemeine Aktivität gegenüber Geschwistertieren mit unveränderten *Shank1*-Allelen gefunden (Hung *et al.* 2008, Silverman *et al.* 2011).

Der *Open Field*- und *Elevated Plus Maze*-Versuch liefert keine Hinweise auf ein verändertes Angstverhalten bei FMRP-defizienten Mäusen. Hierzu bisher veröffentlichte Studien kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Auch wenn man lediglich Studien mit Mäusen eines C57BL/6-Hintergrundes berücksichtigt, ist das durch Messung der im Zentrum des *Open Field*-Arealen verbrachten Zeit ermittelte Maß für die Ängstlichkeit der *Fmr1*-Knockout-Mäuse in einigen Studien geringer (Spencer *et al.* 2005, Hayashi *et al.* 2007, Westmark *et al.* 2011) und in anderen Studien unverändert (Nielsen *et al.* 2002, Spencer *et al.* 2006, Veeraragavan *et al.*

2011, Spencer *et al.* 2011) gegenüber Wildtyp-Tieren. Bei Beurteilung des Angstverhaltens im *Elevated Plus Maze* wurde ebenso eine verringerte (Heulens *et al.* 2012) wie auch eine unveränderte Ängstlichkeit (Mineur *et al.* 2002, Nielsen *et al.* 2002, Moy *et al.* 2009, Yuskaitis *et al.* 2010) publiziert. Die Datenlage ist also auch hier heterogen. In unseren Untersuchungen führt die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels bei den FS-Mäusen zu keiner Veränderung der Ängstlichkeit. Bei der alleinigen Inaktivierung eines *Shank1*-Allels bei den S-Mäusen deuten die *Open Field*-Ergebnisse zur im Zentrum verbrachten Zeit auf eine erhöhte Ängstlichkeit hin, was sich im *Elevated Plus Maze* allerdings nicht bestätigt hat. In einer früheren Untersuchung wurde bei einer alleinigen Inaktivierung eines *Shank1*-Allels keine veränderte Aufenthaltsdauer im Zentrum gefunden, lediglich die vollständige Inaktivierung resultierte in einer erhöhten Ängstlichkeit (Hung *et al.* 2008, Silverman *et al.* 2011).

Für alle untersuchten Genotypen konnte im *Y-Maze*-Versuch ein funktionierendes Arbeitsgedächtnis gezeigt werden. Die F-Mäuse schneiden etwas schlechter ab als WT-, FS-, und S-Mäuse und verpassen knapp die Signifikanzgrenze zur durch Zufall entstehenden Korrektheitsquote von 50 %. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen können nicht festgestellt werden, weder eine vollständige *Fmr1*-Inaktivierung noch die Inaktivierung eines *Shank1*-Allels zusätzlich oder alleine beeinflusst das Arbeitsgedächtnis. In einer früheren Untersuchung FMRP-defizienter Mäuse im *Y-Maze* haben diese eine signifikant schlechtere Korrektheitsquote erzielt als Wildtyp-Mäuse (Mineur *et al.* 2002, Bilousova *et al.* 2009), in mindestens einer anderen Untersuchung hingegen konnten keine Defizite des Arbeitsgedächtnis gefunden werden (Yan *et al.* 2004).

Die Untersuchungen des *Social Interaction*-Tests deuten darauf hin, dass männliche F-Mäuse gegenüber männlichen WT-Tieren ein signifikant höheres Interesse an Weibchen haben. Dieser Phänotyp ist auch bei zusätzlicher Inaktivierung eines *Shank1*-Allels bei den FS-Mäusen unverändert, sodass hier keine Kompensation beobachtet wird. Auch das S-Tier hat ein erhöhtes Interesse am Weibchen. Der hier beschriebene *Social Interaction*-Test wurde erstmals mit *Fmr1*-Knockout-Mäusen durchgeführt, es gab aber bereits ähnliche Versuche zum Sozialverhalten. Entsprechende Analysen mit FMRP-defizienten Mäusen mit einem C57BL/6-Hintergrund kommen dabei zu unterschiedlichen Ergebnissen: es wurde sowohl ein vermindertes soziales Interesse gefunden (Mineur *et al.* 2006, Dahlhaus & El-Husseini 2010, Qin *et al.* 2011), als auch ein Steigerung (Spencer *et al.* 2005, Spencer *et al.* 2011, Thomas *et al.*

2011a) und auch kein Unterschied zu Wildtyp-Tieren (Moy *et al.* 2009). Bei Geschwistertieren mit entweder einer vollständigen *Shank1*-Inaktivierung, einer Inaktivierung eines *Shank1*-Allels oder mit aktiven *Shank1*-Allelen (also letztlich WT-Tiere) wurde in allen drei Fällen ein stark verringertes Interesse an sozialen Interaktionen gefunden gegenüber Wildtyp-Mäusen mit nominell demselben genetischen Hintergrund (B6/Jae) aus einer separaten Linie, welche das erwartete Sozialverhalten zeigten (Silverman *et al.* 2011). Diese Diskrepanz bei den theoretisch als genetisch gleich zu betrachtenden WT-Tieren zeigt die leichte Beeinflussbarkeit von Verhaltensuntersuchungen auf. Bei Menschen mit einem funktionellen Ausfall eines *Shank1*-Allels werden ebenfalls verringerte soziale Interaktionen festgestellt (Sato *et al.* 2012).

Die Lern- bzw. Gedächtnisleistung wurde mittels *Fear Conditioning* und *Inhibitory Avoidance Extinction* untersucht. Hierbei unterschieden sich FMRP-defiziente Mäuse von Wildtyp-Mäusen durch eine bessere Lern- bzw. Erinnerungsleistung, und dieser Phänotyp wurde nicht durch die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels verändert. Im *Fear Conditioning* zeigen F- und FS-Mäuse eine ähnliche Immobilitätsrate (*Freezing*) als Reaktion auf den Stromschlag, was auf eine vergleichbare Lern- bzw. Gedächtnisleistung hinweist. Die WT- und S-Mäuse zeigen hier geringere Immobilitätsraten, wobei zu beachten ist, dass die Immobilität der Wildtyp-Tiere ungewöhnlich gering ausfällt, und auch die wieder ansteigende Immobilität am dritten Versuchstag ungewöhnlich ist. Es sollte beachtet werden, dass sich die hier untersuchten Wildtyp-Tiere nicht erwartungsgemäß verhalten, und sie daher nur eingeschränkt für Vergleiche herangezogen werden sollten. Da es sich nicht um Geschwister-tiere handelt, ist dieser Vergleich ohnehin mit Vorsicht zu betrachten. Zuvor fanden andere Arbeitsgruppen in entsprechenden Versuchen keinen Unterschied zwischen FMRP-defizienten und Wildtyp-Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund (Dobkin *et al.* 2000, Van Dam *et al.* 2000, Peier *et al.* 2000, Spencer *et al.* 2006, Thomas *et al.* 2011a, Spencer *et al.* 2011) oder es wurde weniger Immobilität bei den FMRP-defizienten Mäusen festgestellt (Paradee *et al.* 1999). Insofern ist unsere Beobachtung einer vermehrten Immobilität bei FMRP-Defizienz ungewöhnlich und bestärkt die Zweifel an der Verlässlichkeit des Vergleichs zwischen WT- und F-Mäusen in unserem Versuch. Beim *Inhibitory Avoidance Extinction*-Test beobachtet man bei F- und FS-Mäusen höhere Latenzzeiten als bei Wildtyp-Tieren, und auch dies deutet auf eine bessere Lern- bzw. Gedächtnisleistung hin. Allerdings ist dies ebenfalls konträr zu bereits publizierten Daten (Dölen *et al.* 2007, Michalon *et al.* 2012).



Was dennoch Bestand hat, ist die Erkenntnis, dass die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels keinen Einfluss auf die Lern- bzw. Gedächtnisleistung FMRP-defizienter Mäuse hat. Dies zeigt sich sowohl im *Fear Conditioning* als auch im *Inhibitory Avoidance Extinction*-Versuch durch vergleichbare Werte von F- und FS-Mäusen. Mäuse mit einer vollständigen *Shank1*-Inaktivierung fielen in früheren *Fear Conditioning*-Untersuchungen durch ein schlechteres Lernvermögen bzw. Gedächtnis auf (Hung *et al.* 2008). Neben der Lern- bzw. Gedächtnisleistung wird auch das Extinktionsvermögen nicht durch die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels beeinflusst. Auch dies zeigt sich sowohl im *Fear Conditioning* im Verlauf der Immobilitätsraten der F- und FS-Mäuse an Tag 2 und Tag 3, als auch beim *Inhibitory Avoidance Extinction*-Versuch an den Latenzzeiten der Zeitpunkte 24 und 48 Stunden, wobei im Vergleich zu den untersuchten WT-Tieren ein schlechteres Extinktionsvermögen bei F- und FS-Mäusen festgestellt werden kann.

Zusammenfassend unterschieden sich die untersuchten FMRP-defizienten Mäuse von Wildtyp-Mäusen in den durchgeführten Verhaltensanalysen durch eine verringerte allgemeine Aktivität, ein erhöhtes Interesse an Weibchen, ein besseres Lernvermögen bzw. Gedächtnis und eine geringere Fähigkeit, gelerntes Wissen aufgrund neuer Erfahrungen zu revidieren. Da keine Geschwistertiere miteinander verglichen wurden und es bei den Wildtyp-Mäusen teilweise zu unerwarteten Werten kam, sind diese Ergebnisse möglicherweise auf genetische Differenzen, die über Unterschiede im *Fmr1*-Gen hinausgehen, zurückzuführen. Der Vergleich von F- und FS-Geschwistertieren zeigt, dass die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels in keiner Verhaltensanalyse zu einer signifikanten Veränderung führt. Die alleinige Inaktivierung eines *Shank1*-Allels in den S-Mäusen führte zu einer verringerten Aktivität, einem leicht erhöhten Interesse an Weibchen und einem schlechterem Extinktionsvermögen gegenüber Wildtyp-Tieren; hierbei ist ebenfalls zu beachten, dass keine Geschwister-tiere verglichen wurden.

Durch diese Arbeit wird deutlich, dass eine Reduktion der Shank1-Proteinmenge den durch FMRP-Defizienz hervorgerufenen Phänotyp nicht kompensieren kann. Die zusätzliche Inaktivierung eines *Shank1*-Allels bewirkt – mit Ausnahme der Dornenmorphologie – keine Veränderung zu FMRP-defizienten Mäusen in den untersuchten Parametern. Letztlich ist eine Reduktion auf 80 % bzw. 84 % eine moderate Veränderung, die offenbar in den meisten Fällen ohne deutliche Konsequenzen bleibt bzw. dessen Folgen auf anderer Ebene kompensiert

werden können, z.B. durch eine veränderte Regulation der Konzentration anderer PSD-Proteine. Die zuvor bei FMRP-Defizienz beobachtete Erhöhung der Shank1-Konzentration in postsynaptischen Bereichen ist unter Umständen nicht auf den Ausfall von FMRP zurückzuführen, sondern in anderen genetischen Einflüssen begründet. Zusammengenommen deuten die Ergebnisse meiner Arbeit darauf hin, dass der Phänotyp des Fragilen X-Syndroms nicht durch eine Fehlregulation von Shank1 verursacht wird.

Insgesamt ist die Datenlage zu Verhaltensversuchen mit FMRP-defizienten Mäusen sehr uneinheitlich und teilweise widersprüchlich. Zusammen mit den Untersuchungen zur Dornenmorphologie ergibt sich – auch unabhängig von den Ergebnissen dieser Arbeit – das Bild eines wenig robusten Phänotyps beim Mausmodell des Fragilen X-Syndroms. Bemerkenswert verlässlich hingegen ist lediglich der Phänotyp der erhöhten Anfälligkeit für akustisch ausgelöste Krampfanfälle. Bei der Verwendung unterschiedlicher Mauslinien mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund (z. B: C57BL/6 und FVB) wird deutlich, wie sehr fast alle Ergebnisse offenbar von anderen Faktoren des Genoms beeinflusst werden. Und auch die Verwendung von Mäusen der nominell identischen Mauslinie aus verschiedenen, separat geführten Tierhaltungen kann zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, wodurch unterstrichen wird, wie wenig robust die teilweise beschriebenen Phänotypen sind (Moy *et al.* 2009). Auch Unterschiede zwischen verschiedenen Tierhaltungen in Aufzucht und Haltung können ganz allgemein zu unterschiedlichen Ergebnissen führen (Wahlsten 2001, Wahlsten *et al.* 2003) und letztlich werden Unterschiede im genetischen Hintergrund von Versuchstieren immer eine unvermeidbare Variable bleiben – Mutationen und genetische Drift sind nicht zu verhindern. Lediglich innerhalb einer Analyse kann der Vergleich von Geschwistertieren Unterschiede im genetischen Hintergrund minimieren und zusammen mit der Untersuchung möglichst robuster Phänotypen eindeutige Aussagen zulassen. Zudem ist zu beachten, dass nicht jede Inaktivierung eines Gens in der Maus zu demselben Phänotyp führt, der beim Menschen bei Ausfall des entsprechenden Gens beobachtet wird. Dies ist z.B. bei der *Parkin*-Knockout-Maus der Fall, die entgegen der Erwartung nicht die Symptome der autosomalen rezessiven Form der juvenilen Parkinson-Erkrankung widerspiegelt, obwohl der Situation beim Menschen entsprechend das homologe Gen inaktiv ist (Perez & Palmiter 2005). Ebenso wäre es beim Mausmodell des Fragilen X-Syndroms möglich, dass nicht alle Symptome des Menschen als Phänotyp der Maus wiedergefunden werden können.

Zu guter Letzt könnte zukünftig auch die *Fmr1*-Knockout-Ratte bedeutsam werden, die Ende 2011 erstmalig von SAGE Labs (Sigma-Aldrich) präsentiert wurde und Hoffnungen auf zusätzliche Analysemöglichkeiten und ein eventuell stimmigeres und robusteres Krankheitsmodell weckt.

Dem Mausmodell des Fragilen X-Syndroms sind offenbar Grenzen gesetzt, aber dennoch kann man ihm seine wichtige Rolle bei der Erforschung und Behandlung der Erkrankung nicht absprechen: im Mausmodell wurden Medikamente getestet, welche nun bereits in klinischen Phase II-Studien an Menschen eingesetzt werden und durchaus vielversprechende Ergebnisse erzielen (Krueger & Bear 2010, Kuehn 2011). Bei all ihren Einschränkungen erfüllt die *Fmr1*-Knockout-Maus somit dennoch ihren Zweck und leistet einen wichtigen Beitrag auf dem Weg zur Behandlung des Fragilen X-Syndroms.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Fragile X-Syndrom (FXS) ist die zweithäufigste genetische Ursache einer mentalen Retardierung und zeichnet sich durch das Fehlen des Proteins FMRP aus. FMRP ist u. a. an der Basis dendritischer Dornen lokalisiert und bindet mRNA. Im Mausmodell wurde in Abwesenheit von FMRP ein Hauptgerüstprotein der postsynaptischen Dichte, Shank1, in einer erhöhten Konzentration gefunden. FMRP interagiert mit der Shank1-mRNA und scheint dessen Translation zu reprimieren. Um zu untersuchen, ob die anomale Erhöhung von Shank1 in Abwesenheit von FMRP von Bedeutung für den beobachteten FXS-Phänotyp ist, wurden durch neue Verpaarungen Geschwistermäuse generiert, welche entweder nur FMRP-defizient sind (F-Mäuse) oder bei welchen zusätzlich zur FMRP-Defizienz ein *Shank1*-Allel inaktiviert wurde (FS-Mäuse). Hierdurch soll die bei FMRP-Defizienz nachgewiesene erhöhte postsynaptische Shank1-Konzentration auf ein Wildtyp-ähnliches Niveau reduziert werden und die FS-Tiere wurden in Hinblick auf eine Kompensation diverser FXS-Phänotypen untersucht.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Untersuchungen zeigte sich, dass die zuvor beobachtete Erhöhung der postsynaptischen *Shank1*-Konzentration offenbar nicht ausschließlich auf das Fehlen von FMRP zurückzuführen ist. Die durch neue Verpaarungen entstandenen F-Mäuse wiesen eine den Wildtyp-Mäusen aus einer separaten Zuchtlinie (WT) entsprechende Konzentration von postsynaptischem Shank1 auf. Andere genetische Faktoren als das mutierte *Fmr1*-Gen scheinen für die in der ursprünglichen *Fmr1*-Knockout-Linie nachgewiesene Erhöhung von postsynaptischem Shank1 verantwortlich zu sein. Die FS-Mäuse wiesen eine postsynaptische Shank1-Konzentration von 80 % des Niveaus der F-Mäuse und 84 % des WT-Niveaus auf. In weiteren Untersuchungen unterschieden sich sowohl F- als auch FS-Mäuse durch ein erhöhtes juveniles Körpergewicht und ein erhöhtes Testesgewicht von den untersuchten WT-Mäusen. Die Untersuchung der Anfälligkeit für akustisch ausgelöste Krampfanfälle zeigte bei F- und FS-Mäusen eine stark erhöhte Anfälligkeit, welche bei WT-Tieren nicht beobachtet wurde. In histologischen Untersuchungen wurde in zwei Entfernungen vom Soma und bei zwei Altersstufen die Dichte und Morphologie dendritischer Dornen untersucht. Dabei zeigten sich keine einheitlichen Unterschiede zwischen WT- und F-Mäusen, während FS-Mäuse demgegenüber eher durch filopodienförmige-

re Dornen auffielen. In Verhaltensanalysen wurde für F- und FS-Mäuse eine geringere allgemeine Aktivität als für WT-Tiere gefunden wurde. Die Untersuchung des Sozialverhaltens zeigte bei männlichen F- und FS-Tieren ein höheres Interesse an Weibchen als bei WT-Mäusen. Weiterhin deuten zwei durchgeführte Analysen bei F- und FS-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren auf ein besseres Lern- bzw. Erinnerungsvermögen sowie eine verminderte Fähigkeit, zuvor Gelerntes revidieren zu können, hin. In Angstverhalten und Arbeitsgedächtnis zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-, F- und FS-Tieren.

Es lässt sich aus dieser Arbeit ableiten, dass der FXS-Phänotyp nicht in einer erhöhten postsynaptischen Shank1-Konzentration begründet ist. Die Halbierung der *Shank1*-Gendosis führt lediglich zu einer moderaten Reduktion der postsynaptischen Shank1-Konzentration. Dies resultiert in einer veränderten Dornenmorphologie, während die anderen untersuchten Parameter zwischen F- und FS-Mäusen unverändert blieben. Im Rahmen dieser Arbeit wird des Weiteren ausführlich diskutiert, dass der genetische Hintergrund bei *Fmr1*-Knockout-Mäusen signifikanten Einfluss auf die beobachteten Phänotypen nehmen kann. Dies kann auch zu den in der Literatur zu findenden, untereinander widersprüchlichen Versuchsergebnissen beitragen. Insgesamt ergibt sich für die *Fmr1*-Knockout-Maus das Bild eines wenig robusten Krankheitsmodells, bei dem nur die Anfälligkeit für akustisch ausgelöste Krampfanfälle verlässlich reproduziert werden kann.

## 6 LITERATUR

- Abbott, L. F. and Nelson, S. B. (2000) Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat Neurosci*, **3 Suppl**, 1178-1183.
- Abitbol, M., Menini, C., Delezoide, A. L., Rhyner, T., Vekemans, M. and Mallet, J. (1993) Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nat Genet*, **4**, 147-153.
- Akert, K., Moor, H., Pfenninger, K. and Sandri, C. (1969) Contributions of new impregnation methods and freeze etching to the problems of synaptic fine structure. *Progress in brain research*, **31**, 223-240.
- Ashley, C. T., Jr., Wilkinson, K. D., Reines, D. and Warren, S. T. (1993a) FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science*, **262**, 563-566.
- Ashley, C. T., Sutcliffe, J. S., Kunst, C. B., Leiner, H. A., Eichler, E. E., Nelson, D. L. and Warren, S. T. (1993b) Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat Genet*, **4**, 244-251.
- Baker, K. B., Wray, S. P., Ritter, R., Mason, S., Lanthorn, T. H. and Savelieva, K. V. (2010) Male and female Fmr1 knockout mice on C57 albino background exhibit spatial learning and memory impairments. *Genes Brain Behav*, **9**, 562-574.
- Baron, M. K., Boeckers, T. M., Vaida, B., Faham, S., Gingery, M., Sawaya, M. R., Salyer, D., Gundelfinger, E. D. and Bowie, J. U. (2006) An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density. *Science*, **311**, 531-535.
- Bear, M. F. and Malenka, R. C. (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol*, **4**, 389-399.
- Berkovitz, G. D., Wilson, D. P., Carpenter, N. J., Brown, T. R. and Migeon, C. J. (1986) Gonadal function in men with the Martin-Bell (fragile-X) syndrome. *Am J Med Genet*, **23**, 227-239.
- Bernardet, M. and Crusio, W. E. (2006) Fmr1 KO mice as a possible model of autistic features. *ScientificWorldJournal*, **6**, 1164-1176.
- Bhakar, A. L., Dolen, G. and Bear, M. F. (2012) The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annu Rev Neurosci*, **35**, 417-443.
- Bilousova, T. V., Dansie, L., Ngo, M., Aye, J., Charles, J. R., Ethell, D. W. and Ethell, I. M. (2009) Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioural performance in the fragile X mouse model. *J Med Genet*, **46**, 94-102.
- Boeckers, T. M., Bockmann, J., Kreutz, M. R. and Gundelfinger, E. D. (2002) ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J Neurochem*, **81**, 903-910.
- Boeckers, T. M., Kreutz, M. R., Winter, C. et al. (1999a) Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density. *J Neurosci*, **19**, 6506-6518.

- Boeckers, T. M., Winter, C., Smalla, K. H., Kreutz, M. R., Bockmann, J., Seidenbecher, C., Garner, C. C. and Gundelfinger, E. D. (1999b) Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family. *Biochem Biophys Res Commun*, **264**, 247-252.
- Brown, W. T., Jenkins, E. C., Krawczun, M. S. et al. (1986) The fragile X syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, **477**, 129-150.
- Casellas, J. (2011) Inbred mouse strains and genetic stability: a review. *Animal*, **5**, 1-7.
- Casellas, J. and Medrano, J. F. (2008) Within-generation mutation variance for litter size in inbred mice. *Genetics*, **179**, 2147-2155.
- Castren, M., Haapasalo, A., Oostra, B. A. and Castren, E. (2001) Subcellular localization of fragile X mental retardation protein with the I304N mutation in the RNA-binding domain in cultured hippocampal neurons. *Cell Mol Neurobiol*, **21**, 29-38.
- Chen, L. and Toth, M. (2001) Fragile X mice develop sensory hyperreactivity to auditory stimuli. *Neuroscience*, **103**, 1043-1050.
- Chuang, S. C., Zhao, W., Bauchwitz, R., Yan, Q., Bianchi, R. and Wong, R. K. (2005) Prolonged epileptiform discharges induced by altered group I metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic responses in hippocampal slices of a fragile X mouse model. *J Neurosci*, **25**, 8048-8055.
- Collins, M. O., Husi, H., Yu, L., Brandon, J. M., Anderson, C. N., Blackstock, W. P., Choudhary, J. S. and Grant, S. G. (2006) Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J Neurochem*, **97 Suppl 1**, 16-23.
- Comery, T. A., Harris, J. B., Willems, P. J., Oostra, B. A., Irwin, S. A., Weiler, I. J. and Greenough, W. T. (1997) Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5401-5404.
- Consortium, T. D.-B. F. X. (1994) Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. The Dutch-Belgian Fragile X Consortium. *Cell*, **78**, 23-33.
- Crawford, D. C., Meadows, K. L., Newman, J. L. et al. (2002) Prevalence of the fragile X syndrome in African-Americans. *Am J Med Genet*, **110**, 226-233.
- Cruz-Martin, A., Crespo, M. and Portera-Cailliau, C. (2010) Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice. *J Neurosci*, **30**, 7793-7803.
- D'Hooge, R., Nagels, G., Franck, F. et al. (1997) Mildly impaired water maze performance in male Fmr1 knockout mice. *Neuroscience*, **76**, 367-376.
- Dahlhaus, R. and El-Husseini, A. (2010) Altered neuroligin expression is involved in social deficits in a mouse model of the fragile X syndrome. *Behav Brain Res*, **208**, 96-105.
- Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C. et al. (2011) FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*, **146**, 247-261.
- De Arce, M. A. and Kearns, A. (1984) The fragile X syndrome: the patients and their chromosomes. *J Med Genet*, **21**, 84-91.

- de Brito, R. A., Pletscher, L. S. and Cheverud, J. M. (2005) The evolution of genetic architecture. I. Diversification of genetic backgrounds by genetic drift. *Evolution*, **59**, 2333-2342.
- Devys, D., Lutz, Y., Rouyer, N., Bellocq, J. P. and Mandel, J. L. (1993) The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet*, **4**, 335-340.
- Dobkin, C., Rabe, A., Dumas, R., El Idrissi, A., Haubenstock, H. and Brown, W. T. (2000) Fmr1 knockout mouse has a distinctive strain-specific learning impairment. *Neuroscience*, **100**, 423-429.
- Dölen, G., Osterweil, E., Rao, B. S., Smith, G. B., Auerbach, B. D., Chattarji, S. and Bear, M. F. (2007) Correction of fragile X syndrome in mice. *Neuron*, **56**, 955-962.
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D. and Crow, J. F. (1998) Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, **148**, 1667-1686.
- Du, Y., Weed, S. A., Xiong, W. C., Marshall, T. D. and Parsons, J. T. (1998) Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. *Mol Cell Biol*, **18**, 5838-5851.
- Eberhart, D. E., Malter, H. E., Feng, Y. and Warren, S. T. (1996) The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet*, **5**, 1083-1091.
- Eichler, E. E., Holden, J. J., Popovich, B. W., Reiss, A. L., Snow, K., Thibodeau, S. N., Richards, C. S., Ward, P. A. and Nelson, D. L. (1994) Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nat Genet*, **8**, 88-94.
- El-Husseini, A. E., Schnell, E., Chetkovich, D. M., Nicoll, R. A. and Brecht, D. S. (2000) PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*, **290**, 1364-1368.
- Falley, K., Schutt, J., Iglauer, P. et al. (2009) Shank1 mRNA: dendritic transport by kinesin and translational control by the 5'untranslated region. *Traffic*, **10**, 844-857.
- Feng, Y., Absher, D., Eberhart, D. E., Brown, V., Malter, H. E. and Warren, S. T. (1997a) FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol Cell*, **1**, 109-118.
- Feng, Y., Gutekunst, C. A., Eberhart, D. E., Yi, H., Warren, S. T. and Hersch, S. M. (1997b) Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci*, **17**, 1539-1547.
- Fernandez-Carvajal, I., Walichiewicz, P., Xiaosen, X., Pan, R., Hagerman, P. J. and Tassone, F. (2009) Screening for expanded alleles of the FMR1 gene in blood spots from newborn males in a Spanish population. *J Mol Diagn*, **11**, 324-329.
- Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A. et al. (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*, **67**, 1047-1058.
- Galvez, R. and Greenough, W. T. (2005) Sequence of abnormal dendritic spine development in primary somatosensory cortex of a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome. *Am J Med Genet A*, **135**, 155-160.
- Green, E. L. (1966) *Biology of the Laboratory Mouse*.



- Green, E. L. (1981) *Genetics and Probability in Animal Breeding Experiments*: New York: Oxford University Press. .
- Grossman, A. W., Elisseou, N. M., McKinney, B. C. and Greenough, W. T. (2006) Hippocampal pyramidal cells in adult Fmr1 knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines. *Brain Res*, **1084**, 158-164.
- Harlow, E. G., Till, S. M., Russell, T. A., Wijetunge, L. S., Kind, P. and Contractor, A. (2010) Critical period plasticity is disrupted in the barrel cortex of FMR1 knockout mice. *Neuron*, **65**, 385-398.
- Harris, K. M. and Kater, S. B. (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci*, **17**, 341-371.
- Hayashi, M. L., Rao, B. S., Seo, J. S., Choi, H. S., Dolan, B. M., Choi, S. Y., Chattarji, S. and Tonegawa, S. (2007) Inhibition of p21-activated kinase rescues symptoms of fragile X syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 11489-11494.
- Heulens, I., D'Hulst, C., Van Dam, D., De Deyn, P. P. and Kooy, R. F. (2012) Pharmacological treatment of fragile X syndrome with GABAergic drugs in a knockout mouse model. *Behav Brain Res*, **229**, 244-249.
- Hinds, H. L., Ashley, C. T., Sutcliffe, J. S., Nelson, D. L., Warren, S. T., Housman, D. E. and Schalling, M. (1993) Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet*, **3**, 36-43.
- Hinton, V. J., Brown, W. T., Wisniewski, K. and Rudelli, R. D. (1991) Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, **41**, 289-294.
- Huber, K. M., Gallagher, S. M., Warren, S. T. and Bear, M. F. (2002) Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7746-7750.
- Huber, K. M., Kayser, M. S. and Bear, M. F. (2000) Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science*, **288**, 1254-1257.
- Huber, K. M., Roder, J. C. and Bear, M. F. (2001) Chemical induction of mGluR5- and protein synthesis--dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *J Neurophysiol*, **86**, 321-325.
- Hung, A. Y., Futai, K., Sala, C. et al. (2008) Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1. *J Neurosci*, **28**, 1697-1708.
- Husi, H., Ward, M. A., Choudhary, J. S., Blackstock, W. P. and Grant, S. G. (2000) Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci*, **3**, 661-669.
- Hwu, W. L., Lee, Y. M., Lee, S. C. and Wang, T. R. (1993) In vitro DNA methylation inhibits FMR-1 promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, **193**, 324-329.
- Irwin, S. A., Galvez, R. and Greenough, W. T. (2000) Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cereb Cortex*, **10**, 1038-1044.
- Irwin, S. A., Idupulapati, M., Gilbert, M. E. et al. (2002) Dendritic spine and dendritic field characteristics of layer V pyramidal neurons in the visual cortex of fragile-X knockout mice. *Am J Med Genet*, **111**, 140-146.

- Irwin, S. A., Patel, B., Idupulapati, M. et al. (2001) Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. *Am J Med Genet*, **98**, 161-167.
- Ivanco, T. L. and Greenough, W. T. (2002) Altered mossy fiber distributions in adult Fmr1 (FVB) knockout mice. *Hippocampus*, **12**, 47-54.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. and Jessel, T. M. (2000) *Principles of neural science*.
- Kemp, N. and Bashir, Z. I. (1999) Induction of LTD in the adult hippocampus by the synaptic activation of AMPA/kainate and metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, **38**, 495-504.
- Kennedy, M. B. (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science*, **290**, 750-754.
- Kim, J. J. and Jung, M. W. (2006) Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev*, **30**, 188-202.
- Klauck, T. M. and Scott, J. D. (1995) The postsynaptic density: a subcellular anchor for signal transduction enzymes. *Cellular signalling*, **7**, 747-757.
- Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. and Seeburg, P. H. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, **269**, 1737-1740.
- Korneluk, R. G. and Narang, M. A. (1997) Anticipating anticipation. *Nat Genet*, **15**, 119-120.
- Krueger, D. D. and Bear, M. F. (2010) Toward fulfilling the promise of molecular medicine in fragile X syndrome. *Annu Rev Med*, **62**, 411-429.
- Kuehn, B. M. (2011) Scientists find promising therapies for fragile X and Down syndromes. *JAMA*, **305**, 344-346.
- La Spada, A. R. and Taylor, J. P. (2010) Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nat Rev Genet*, **11**, 247-258.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Liu, Z. H., Chuang, D. M. and Smith, C. B. (2010) Lithium ameliorates phenotypic deficits in a mouse model of fragile X syndrome. *Int J Neuropsychopharmacol*, **14**, 618-630.
- Lominska, C., Levin, J. A., Wang, J., Sikes, J., Kao, C. and Smith, J. D. (2001) Apolipoprotein E deficiency effects on learning in mice are dependent upon the background strain. *Behav Brain Res*, **120**, 23-34.
- Lubs, H. A. (1969) A marker X chromosome. *Am J Hum Genet*, **21**, 231-244.
- Martin, J. P. and Bell, J. (1943) A Pedigree of Mental Defect Showing Sex-Linkage. *J Neurol Psychiatry*, **6**, 154-157.
- McBride, S. M., Choi, C. H., Wang, Y. et al. (2005) Pharmacological rescue of synaptic plasticity, courtship behavior, and mushroom body defects in a Drosophila model of fragile X syndrome. *Neuron*, **45**, 753-764.

- McKinney, B. C., Grossman, A. W., Elisseou, N. M. and Greenough, W. T. (2005) Dendritic spine abnormalities in the occipital cortex of C57BL/6 Fmr1 knockout mice. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, **136B**, 98-102.
- McLennan, Y., Polussa, J., Tassone, F. and Hagerman, R. (2011) Fragile x syndrome. *Curr Genomics*, **12**, 216-224.
- McMurray, C. T. (2010) Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat Rev Genet*, **11**, 786-799.
- Meredith, R. M., Holmgren, C. D., Weidum, M., Burnashev, N. and Mansvelder, H. D. (2007) Increased threshold for spike-timing-dependent plasticity is caused by unreliable calcium signaling in mice lacking fragile X gene FMR1. *Neuron*, **54**, 627-638.
- Michalon, A., Sidorov, M., Ballard, T. M., Ozmen, L., Spooren, W., Wettstein, J. G., Jaeschke, G., Bear, M. F. and Lindemann, L. (2012) Chronic pharmacological mGlu5 inhibition corrects fragile X in adult mice. *Neuron*, **74**, 49-56.
- Mineur, Y. S., Huynh, L. X. and Crusio, W. E. (2006) Social behavior deficits in the Fmr1 mutant mouse. *Behav Brain Res*, **168**, 172-175.
- Mineur, Y. S., Sluyter, F., de Wit, S., Oostra, B. A. and Crusio, W. E. (2002) Behavioral and neuroanatomical characterization of the Fmr1 knockout mouse. *Hippocampus*, **12**, 39-46.
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Young, N. B. et al. (2009) Social approach in genetically engineered mouse lines relevant to autism. *Genes Brain Behav*, **8**, 129-142.
- Mulholland, P. J. and Chandler, L. J. (2007) The thorny side of addiction: adaptive plasticity and dendritic spines. *ScientificWorldJournal*, **7**, 9-21.
- Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J. C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R. J., Worley, P. F. and Sheng, M. (1999) Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron*, **23**, 569-582.
- Nielsen, D. M., Derber, W. J., McClellan, D. A. and Crnic, L. S. (2002) Alterations in the auditory startle response in Fmr1 targeted mutant mouse models of fragile X syndrome. *Brain Res*, **927**, 8-17.
- Nimchinsky, E. A., Oberlander, A. M. and Svoboda, K. (2001) Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci*, **21**, 5139-5146.
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L. and Svoboda, K. (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annual review of physiology*, **64**, 313-353.
- Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boue, J., Bertheas, M. and Mandel, J. (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*, **252**, 1097-1102.
- Oostra, B. A. and Halley, D. J. (1995) Complex behavior of simple repeats: the fragile X syndrome. *Pediatr Res*, **38**, 629-637.
- Oostra, B. A. and Willemsen, R. (2009) FMR1: a gene with three faces. *Biochim Biophys Acta*, **1790**, 467-477.

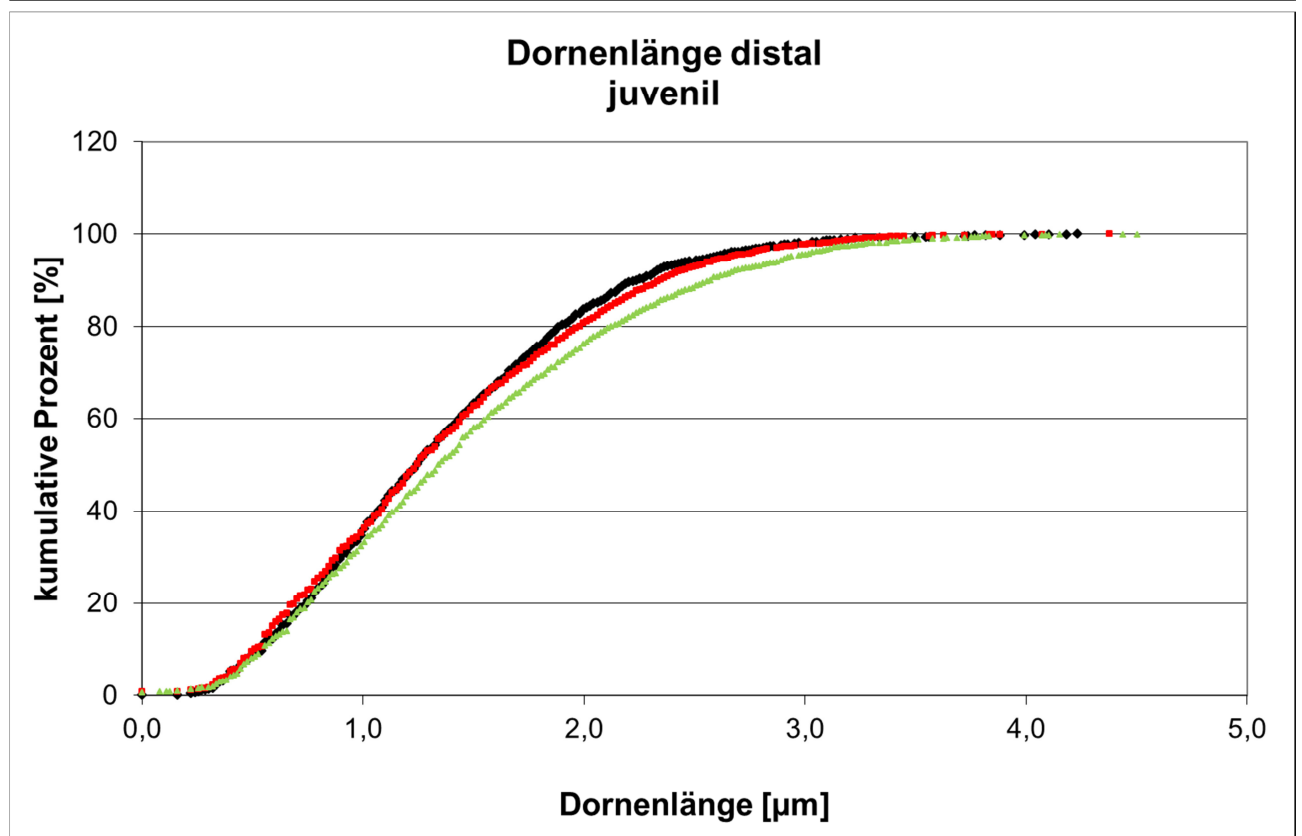
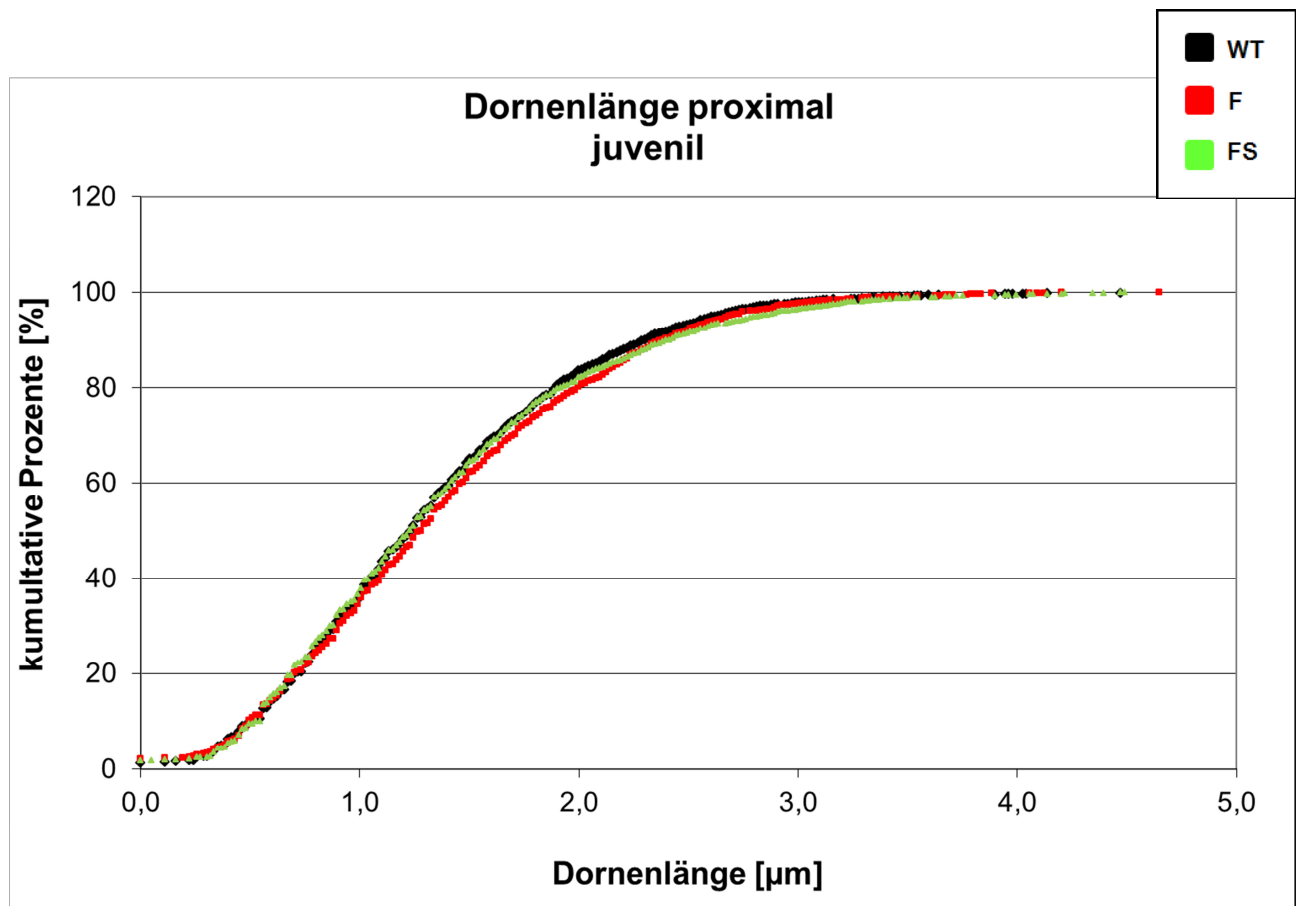
- Pacey, L. K., Doss, L., Cifelli, C., van der Kooy, D., Heximer, S. P. and Hampson, D. R. (2011) Genetic deletion of regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) rescues a subset of fragile X related phenotypes in the FMR1 knockout mouse. *Mol Cell Neurosci*, **46**, 563-572.
- Pacey, L. K., Heximer, S. P. and Hampson, D. R. (2009) Increased GABA(B) receptor-mediated signaling reduces the susceptibility of fragile X knockout mice to audiogenic seizures. *Mol Pharmacol*, **76**, 18-24.
- Palay, S. L. and Palade, G. E. (1955) The fine structure of neurons. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, **1**, 69-88.
- Papioannou, V. E. and Festing, M. F. (1980) Genetic drift in a stock of laboratory mice. *Lab Anim*, **14**, 11-13.
- Paradee, W., Melikian, H. E., Rasmussen, D. L., Kenneson, A., Conn, P. J. and Warren, S. T. (1999) Fragile X mouse: strain effects of knockout phenotype and evidence suggesting deficient amygdala function. *Neuroscience*, **94**, 185-192.
- Park, E., Na, M., Choi, J., Kim, S., Lee, J. R., Yoon, J., Park, D., Sheng, M. and Kim, E. (2003) The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the beta PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem*, **278**, 19220-19229.
- Peier, A. M., McIlwain, K. L., Kenneson, A., Warren, S. T., Paylor, R. and Nelson, D. L. (2000) (Over)correction of FMR1 deficiency with YAC transgenics: behavioral and physical features. *Hum Mol Genet*, **9**, 1145-1159.
- Perez, F. A. and Palmiter, R. D. (2005) Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 2174-2179.
- Pesso, R., Berkenstadt, M., Cuckle, H., Gak, E., Peleg, L., Frydman, M. and Barkai, G. (2000) Screening for fragile X syndrome in women of reproductive age. *Prenat Diagn*, **20**, 611-614.
- Pieretti, M., Zhang, F. P., Fu, Y. H., Warren, S. T., Oostra, B. A., Caskey, C. T. and Nelson, D. L. (1991) Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell*, **66**, 817-822.
- Prut, L. and Belzung, C. (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*, **463**, 3-33.
- Qin, M., Entezam, A., Usdin, K., Huang, T., Liu, Z. H., Hoffman, G. E. and Smith, C. B. (2011) A mouse model of the fragile X premutation: effects on behavior, dendrite morphology, and regional rates of cerebral protein synthesis. *Neurobiol Dis*, **42**, 85-98.
- Qualmann, B., Boeckers, T. M., Jeromin, M., Gundelfinger, E. D. and Kessels, M. M. (2004) Linkage of the actin cytoskeleton to the postsynaptic density via direct interactions of Abp1 with the ProSAP/Shank family. *J Neurosci*, **24**, 2481-2495.
- Raspa, M., Bailey, D. B., Bishop, E., Holiday, D. and Olmsted, M. (2010) Obesity, food selectivity, and physical activity in individuals with fragile X syndrome. *Am J Intellect Dev Disabil*, **115**, 482-495.
- Restivo, L., Ferrari, F., Passino, E., Sgobio, C., Bock, J., Oostra, B. A., Bagni, C. and Ammassari-Teule, M. (2005) Enriched environment promotes behavioral and morphological re-

- covery in a mouse model for the fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11557-11562.
- Richards, R. I. and Sutherland, G. R. (1994) Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nat Genet*, **6**, 114-116.
- Rodgers, R. J. and Dalvi, A. (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev*, **21**, 801-810.
- Rudelli, R. D., Brown, W. T., Wisniewski, K., Jenkins, E. C., Laure-Kamionowska, M., Connell, F. and Wisniewski, H. M. (1985) Adult fragile X syndrome. Clinico-neuropathologic findings. *Acta Neuropathol*, **67**, 289-295.
- Rudy, J. W., Huff, N. C. and Matus-Amat, P. (2004) Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci Biobehav Rev*, **28**, 675-685.
- Sala, C., Piech, V., Wilson, N. R., Passafaro, M., Liu, G. and Sheng, M. (2001) Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron*, **31**, 115-130.
- Sala, C., Roussignol, G., Meldolesi, J. and Fagni, L. (2005) Key role of the postsynaptic density scaffold proteins Shank and Homer in the functional architecture of Ca<sup>2+</sup> homeostasis at dendritic spines in hippocampal neurons. *J Neurosci*, **25**, 4587-4592.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Sato, D., Lionel, A. C., Leblond, C. S. et al. (2012) SHANK1 Deletions in Males with Autism Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet*, **90**, 879-887.
- Schütt, J., Falley, K., Richter, D., Kreienkamp, H. J. and Kindler, S. (2009) Fragile X mental retardation protein regulates the levels of scaffold proteins and glutamate receptors in postsynaptic densities. *J Biol Chem*, **284**, 25479-25487.
- Sheng, M. (2001) Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7058-7061.
- Sheng, M. and Kim, E. (2000) The Shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci*, **113 ( Pt 11)**, 1851-1856.
- Sibilia, M. and Wagner, E. F. (1995) Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*, **269**, 234-238.
- Silver, L. M. (1995) *Mouse Genetics*.
- Silverman, J. L., Turner, S. M., Barkan, C. L., Tolu, S. S., Saxena, R., Hung, A. Y., Sheng, M. and Crawley, J. N. (2011) Sociability and motor functions in Shank1 mutant mice. *Brain Res*, **1380**, 120-137.
- Siomi, H., Choi, M., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L. and Dreyfuss, G. (1994) Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell*, **77**, 33-39.
- Siomi, H., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L. and Dreyfuss, G. (1993) The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell*, **74**, 291-298.
- Soltau, M., Richter, D. and Kreienkamp, H. J. (2002) The insulin receptor substrate IRSp53 links postsynaptic shank1 to the small G-protein cdc42. *Mol Cell Neurosci*, **21**, 575-583.

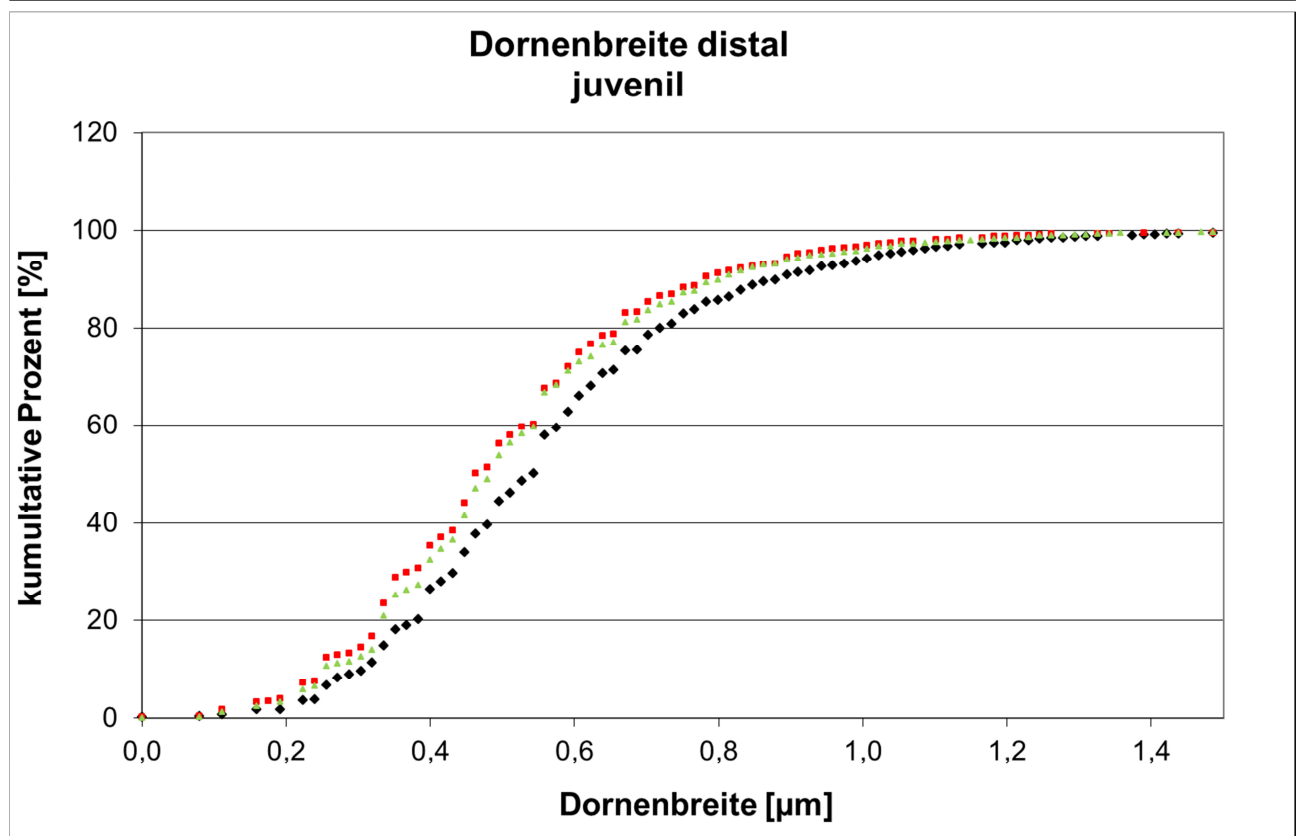
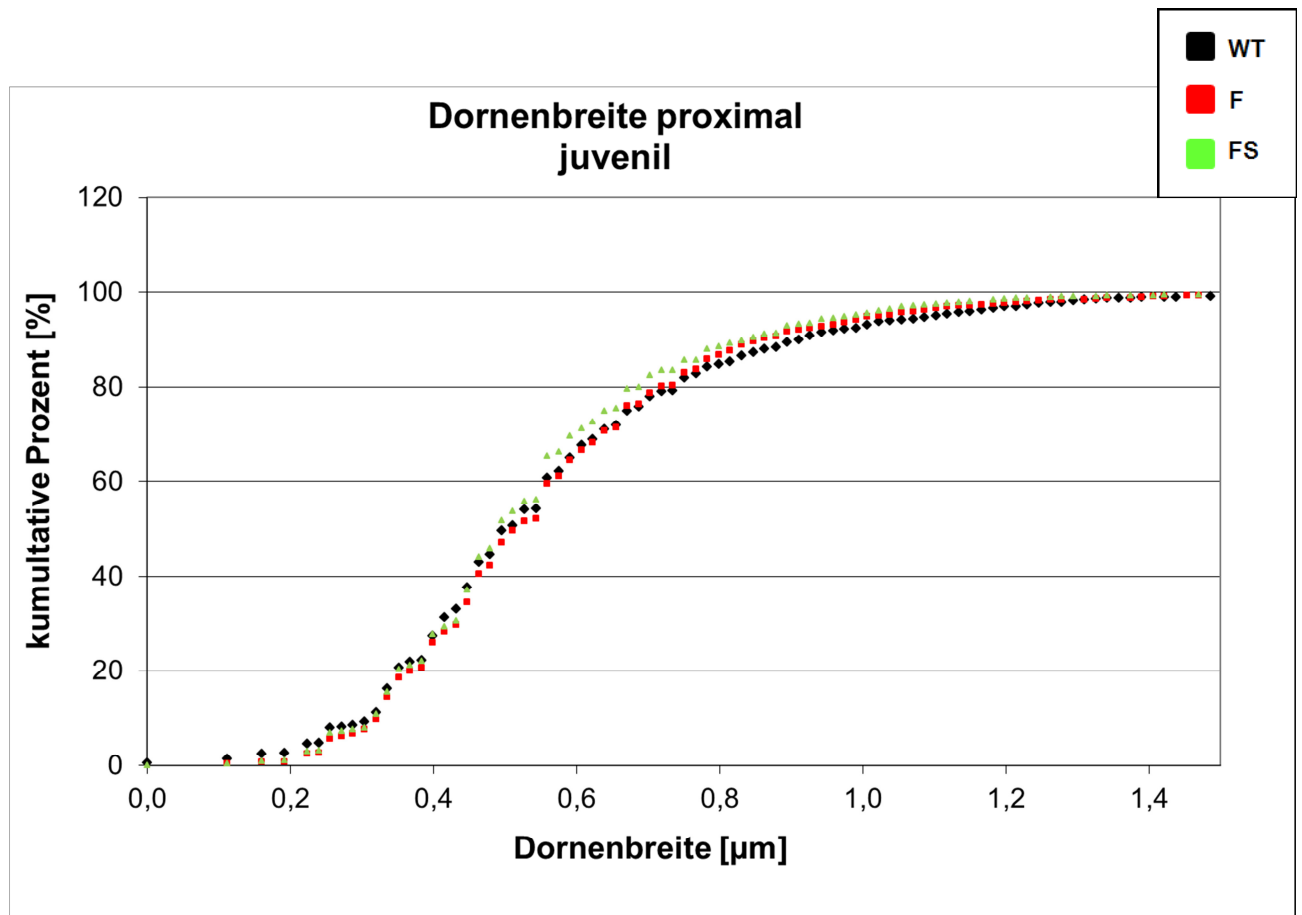
- Spencer, C. M., Alekseyenko, O., Hamilton, S. M., Thomas, A. M., Serysheva, E., Yuva-Paylor, L. A. and Paylor, R. (2011) Modifying behavioral phenotypes in Fmr1KO mice: genetic background differences reveal autistic-like responses. *Autism Res*, **4**, 40-56.
- Spencer, C. M., Alekseyenko, O., Serysheva, E., Yuva-Paylor, L. A. and Paylor, R. (2005) Altered anxiety-related and social behaviors in the Fmr1 knockout mouse model of fragile X syndrome. *Genes Brain Behav*, **4**, 420-430.
- Spencer, C. M., Serysheva, E., Yuva-Paylor, L. A., Oostra, B. A., Nelson, D. L. and Paylor, R. (2006) Exaggerated behavioral phenotypes in Fmr1/Fxr2 double knockout mice reveal a functional genetic interaction between Fragile X-related proteins. *Hum Mol Genet*, **15**, 1984-1994.
- Sprenkel, R., Suchanek, B., Amico, C. et al. (1998) Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell*, **92**, 279-289.
- Stevens, J. C., Banks, G. T., Festing, M. F. and Fisher, E. M. (2007) Quiet mutations in inbred strains of mice. *Trends Mol Med*, **13**, 512-519.
- Sutcliffe, J. S., Nelson, D. L., Zhang, F., Pieretti, M., Caskey, C. T., Saxe, D. and Warren, S. T. (1992) DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*, **1**, 397-400.
- Taft, R. A., Davisson, M. and Wiles, M. V. (2006) Know thy mouse. *Trends Genet*, **22**, 649-653.
- Tamanini, F., Meijer, N., Verheij, C., Willems, P. J., Galjaard, H., Oostra, B. A. and Hoogeveen, A. T. (1996) FMRP is associated to the ribosomes via RNA. *Hum Mol Genet*, **5**, 809-813.
- Tassone, F. and Hagerman, P. J. (2003) Expression of the FMR1 gene. *Cytogenet Genome Res*, **100**, 124-128.
- Thomas, A. M., Bui, N., Graham, D., Perkins, J. R., Yuva-Paylor, L. A. and Paylor, R. (2011a) Genetic reduction of group 1 metabotropic glutamate receptors alters select behaviors in a mouse model for fragile X syndrome. *Behav Brain Res*, **223**, 310-321.
- Thomas, A. M., Bui, N., Perkins, J. R., Yuva-Paylor, L. A. and Paylor, R. (2011b) Group I metabotropic glutamate receptor antagonists alter select behaviors in a mouse model for fragile X syndrome. *Psychopharmacology (Berl)*, **219**, 47-58.
- Tu, J. C., Xiao, B., Naisbitt, S. et al. (1999) Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron*, **23**, 583-592.
- Tucker, B., Richards, R. I. and Lardelli, M. (2006) Contribution of mGluR and Fmr1 functional pathways to neurite morphogenesis, craniofacial development and fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*, **15**, 3446-3458.
- Turner, G., Daniel, A. and Frost, M. (1980) X-linked mental retardation, macro-orchidism, and the Xq27 fragile site. *J Pediatr*, **96**, 837-841.
- Van Dam, D., D'Hooge, R., Hauben, E., Reyniers, E., Gantois, I., Bakker, C. E., Oostra, B. A., Kooy, R. F. and De Deyn, P. P. (2000) Spatial learning, contextual fear conditioning and conditioned emotional response in Fmr1 knockout mice. *Behav Brain Res*, **117**, 127-136.
- Veeraragavan, S., Bui, N., Perkins, J. R., Yuva-Paylor, L. A., Carpenter, R. L. and Paylor, R. (2011) Modulation of behavioral phenotypes by a muscarinic M1 antagonist in a mouse model of fragile X syndrome. *Psychopharmacology (Berl)*, **217**, 143-151.

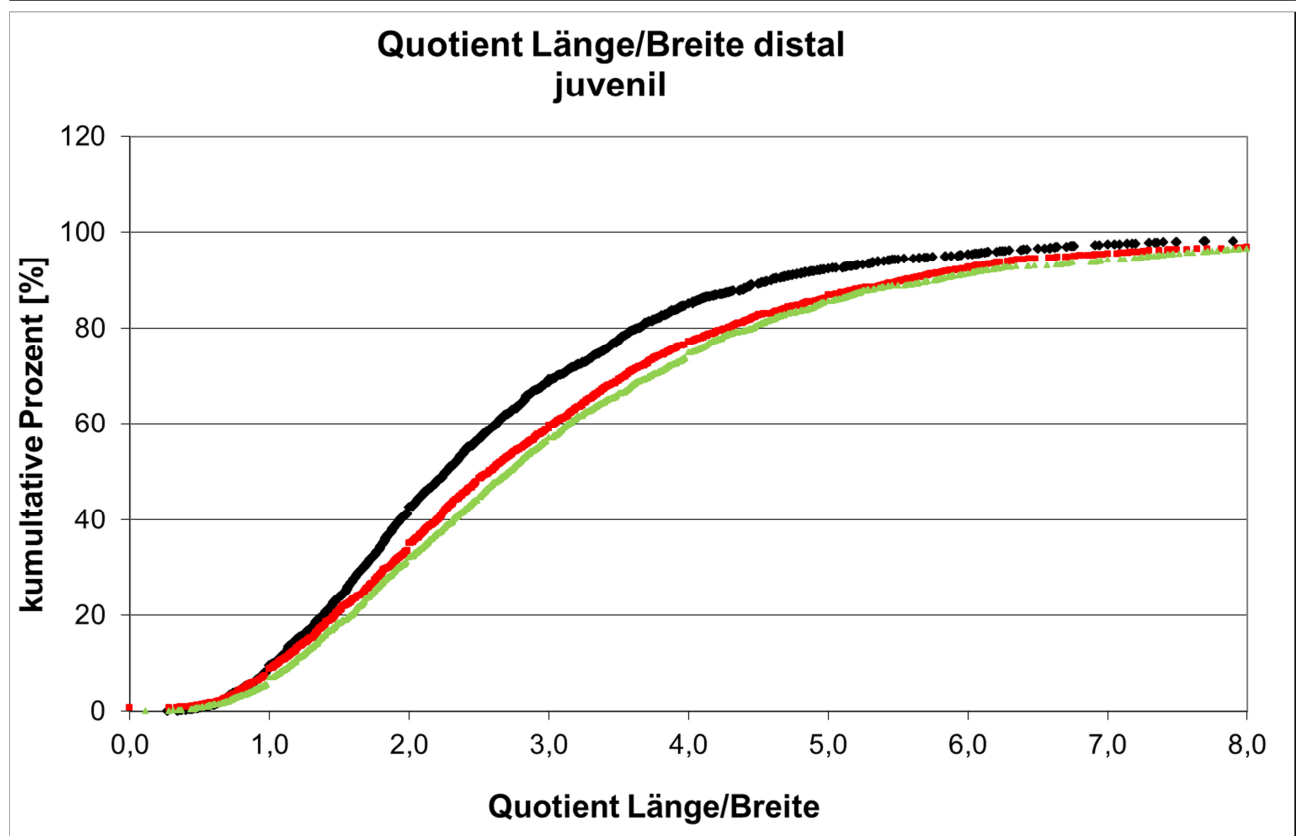
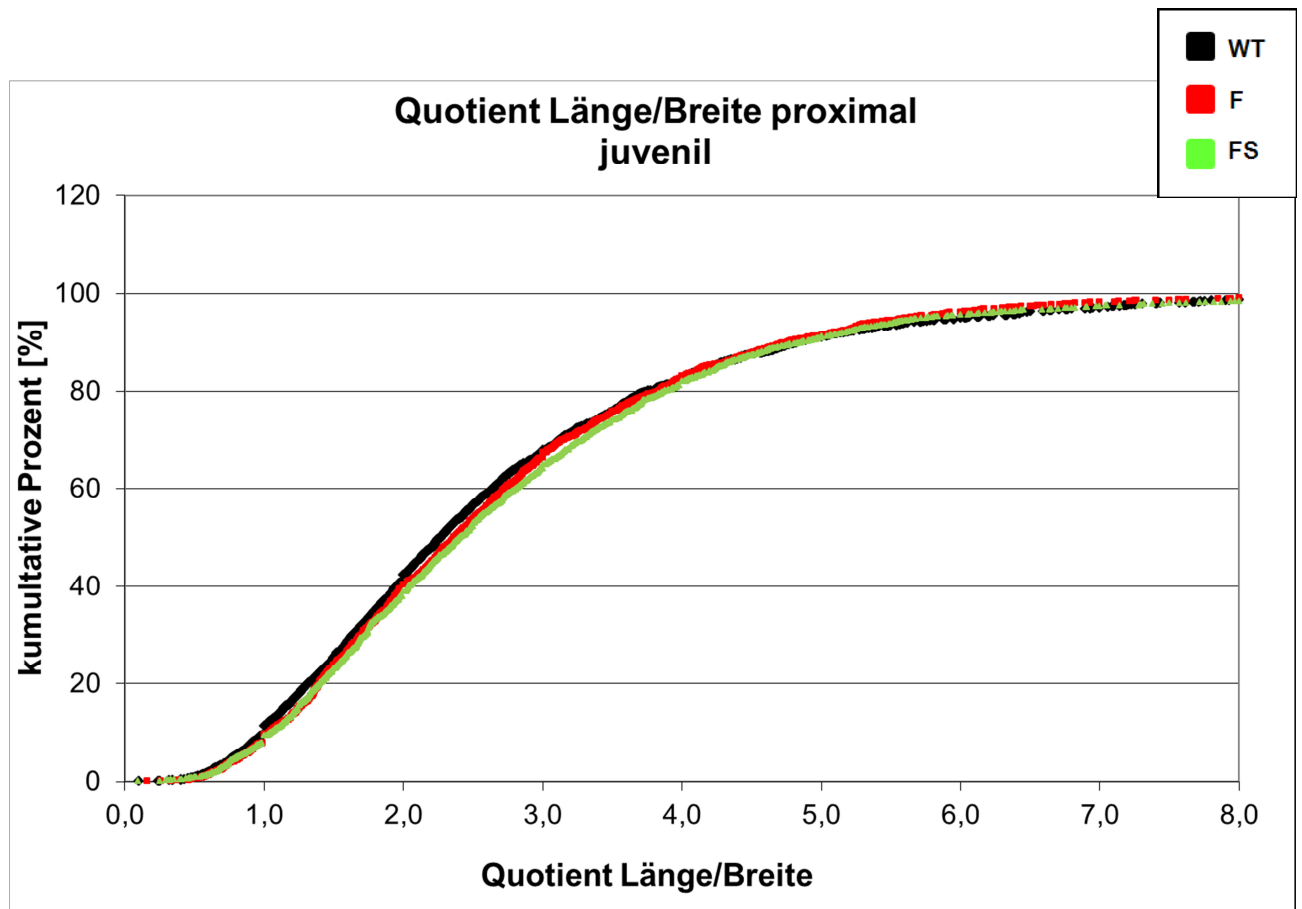
- Verheij, C., Bakker, C. E., de Graaff, E. et al. (1993) Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature*, **363**, 722-724.
- Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S. et al. (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, **65**, 905-914.
- Wahlsten, D. (2001) Standardizing tests of mouse behavior: reasons, recommendations, and reality. *Physiol Behav*, **73**, 695-704.
- Wahlsten, D., Metten, P., Phillips, T. J. et al. (2003) Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction. *J Neurobiol*, **54**, 283-311.
- Westmark, C. J., Westmark, P. R., O'Riordan, K. J. et al. (2011) Reversal of fragile X phenotypes by manipulation of AbetaPP/Abeta levels in Fmr1KO mice. *PLoS One*, **6**, e26549.
- Willemsen, R., Bontekoe, C., Tamanini, F., Galjaard, H., Hoogeveen, A. and Oostra, B. (1996) Association of FMRP with ribosomal precursor particles in the nucleolus. *Biochem Biophys Res Commun*, **225**, 27-33.
- Willemsen, R., Levenga, J. and Oostra, B. A. (2011) CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. *Clin Genet*, **80**, 214-225.
- Wisniewski, K. E., Segan, S. M., Mizejeski, C. M., Sersen, E. A. and Rudelli, R. D. (1991) The Fra(X) syndrome: neurological, electrophysiological, and neuropathological abnormalities. *Am J Med Genet*, **38**, 476-480.
- Yan, Q. J., Asafo-Adjei, P. K., Arnold, H. M., Brown, R. E. and Bauchwitz, R. P. (2004) A phenotypic and molecular characterization of the fmr1-tm1Cgr fragile X mouse. *Genes Brain Behav*, **3**, 337-359.
- Yan, Q. J., Rammal, M., Tranfaglia, M. and Bauchwitz, R. P. (2005) Suppression of two major Fragile X Syndrome mouse model phenotypes by the mGluR5 antagonist MPEP. *Neuropharmacology*, **49**, 1053-1066.
- Yuskaitis, C. J., Mines, M. A., King, M. K., Sweatt, J. D., Miller, C. A. and Jope, R. S. (2010) Lithium ameliorates altered glycogen synthase kinase-3 and behavior in a mouse model of fragile X syndrome. *Biochem Pharmacol*, **79**, 632-646.
- Ziff, E. B. (1997) Enlightening the postsynaptic density. *Neuron*, **19**, 1163-1174.

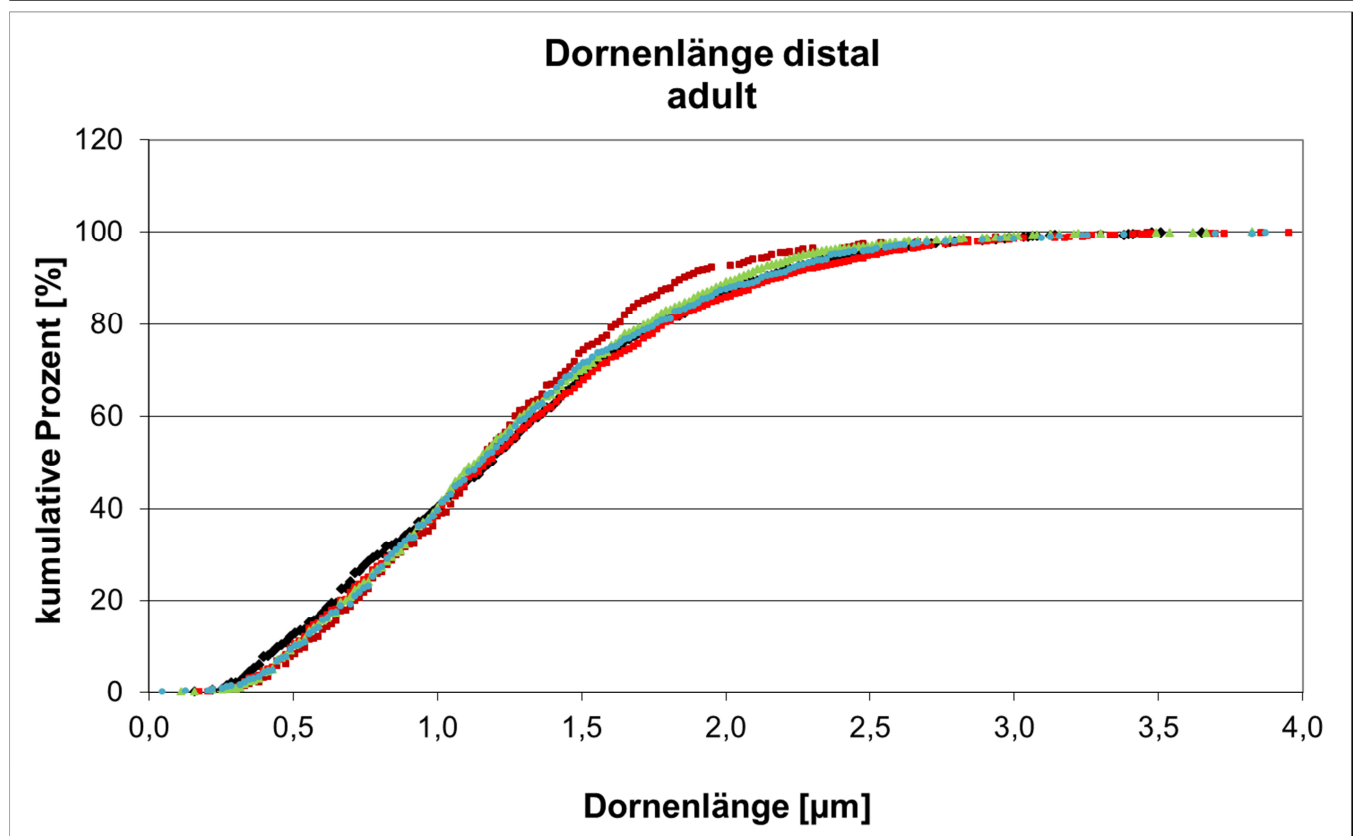
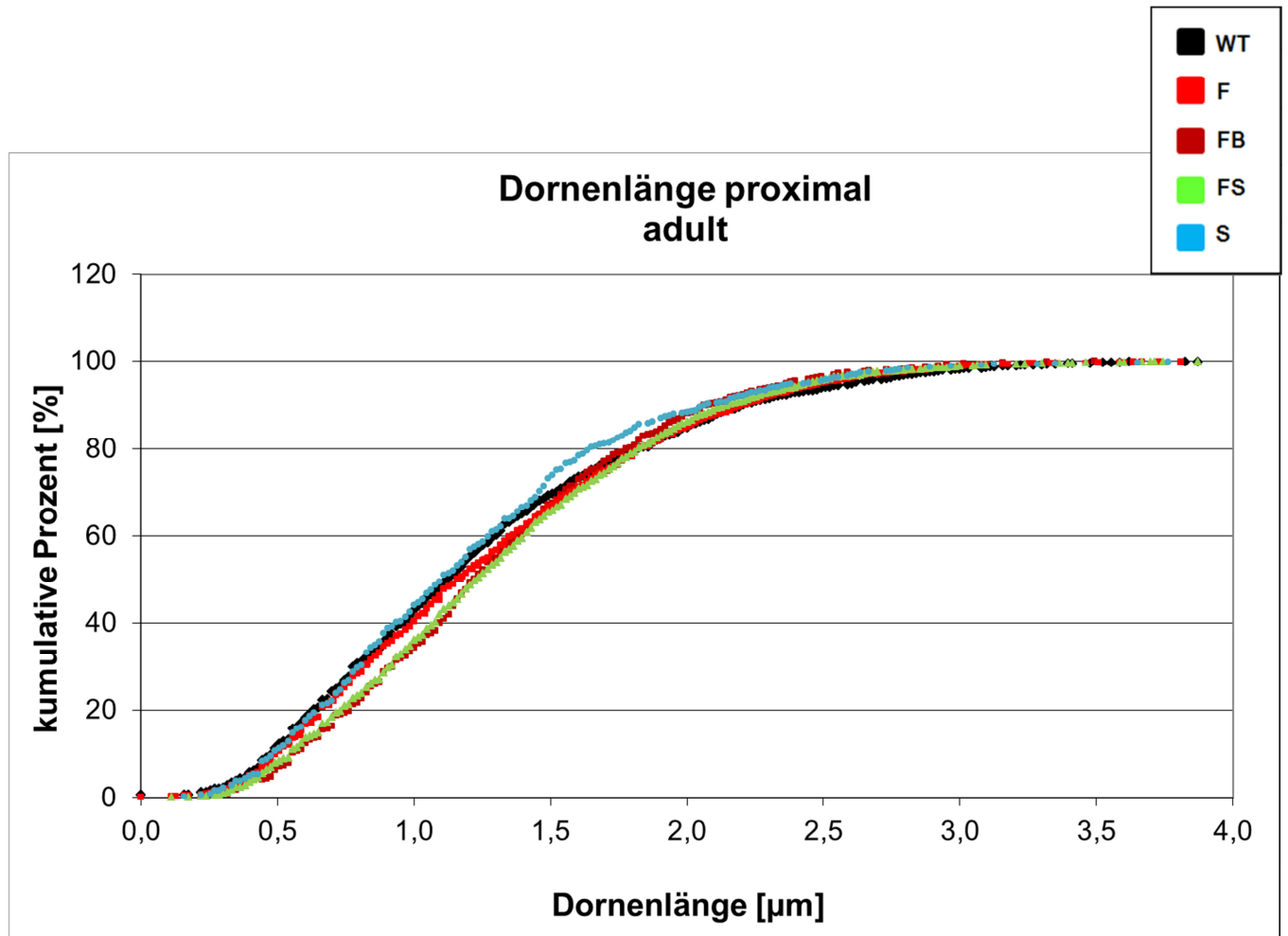
# 7 ANHANG

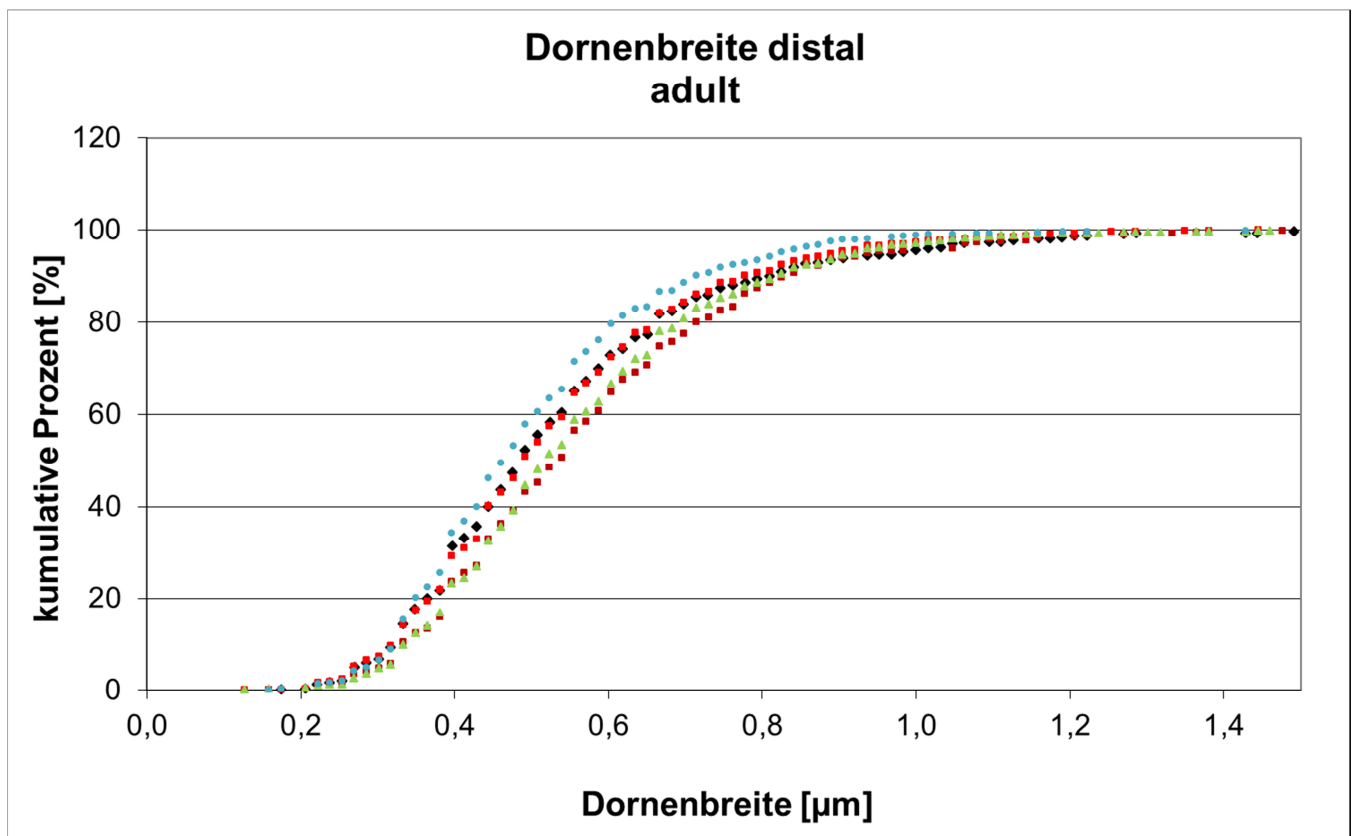
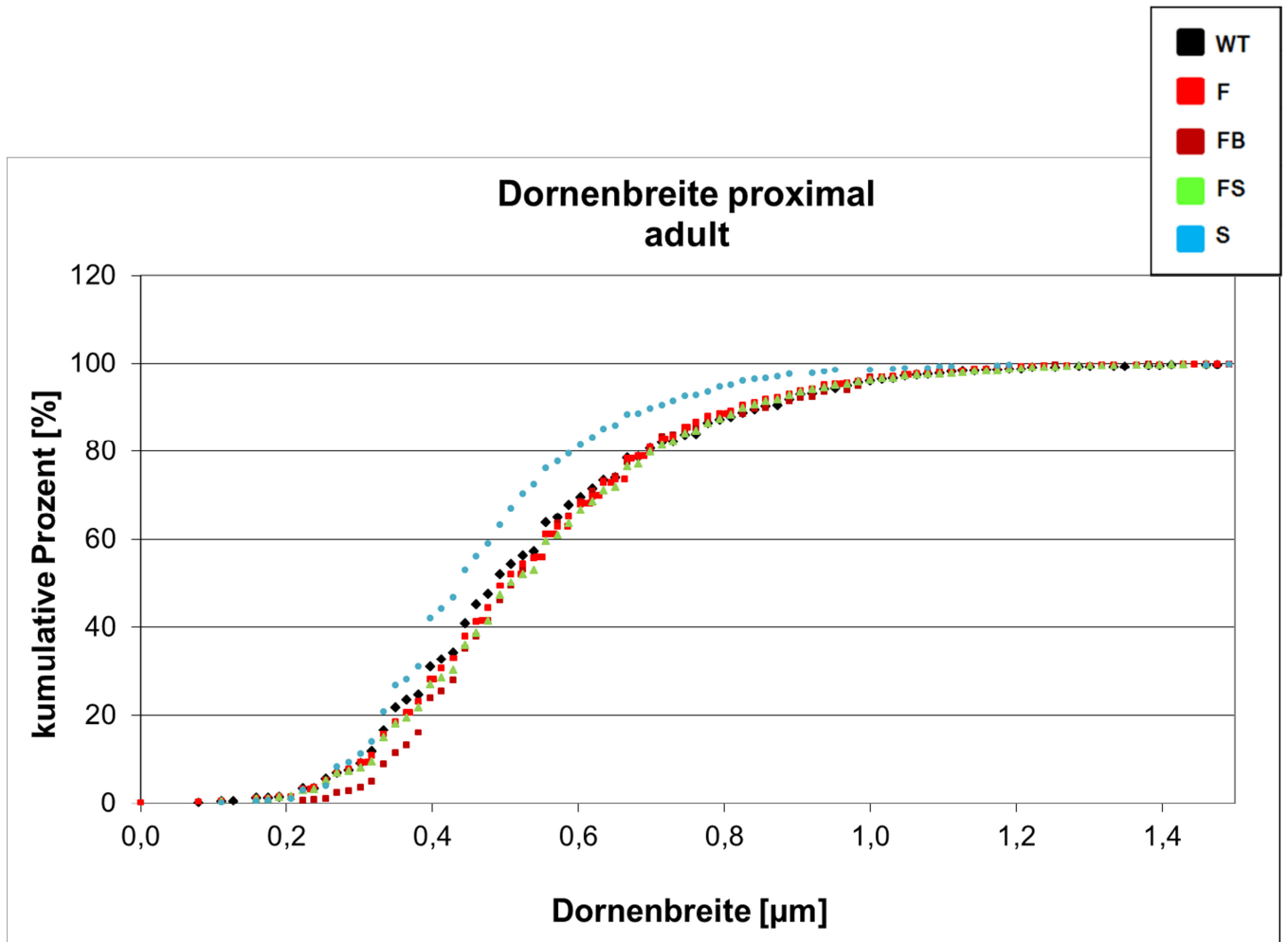


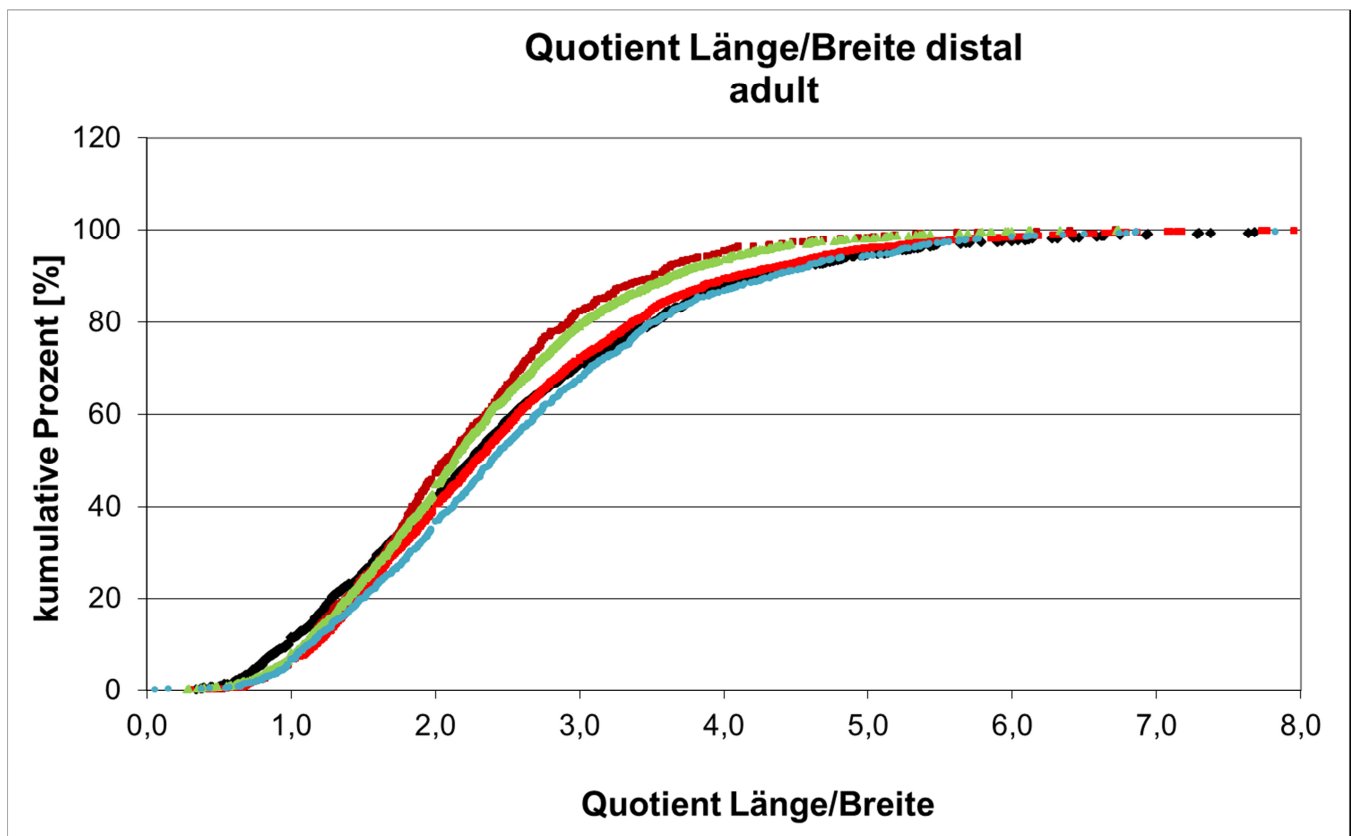
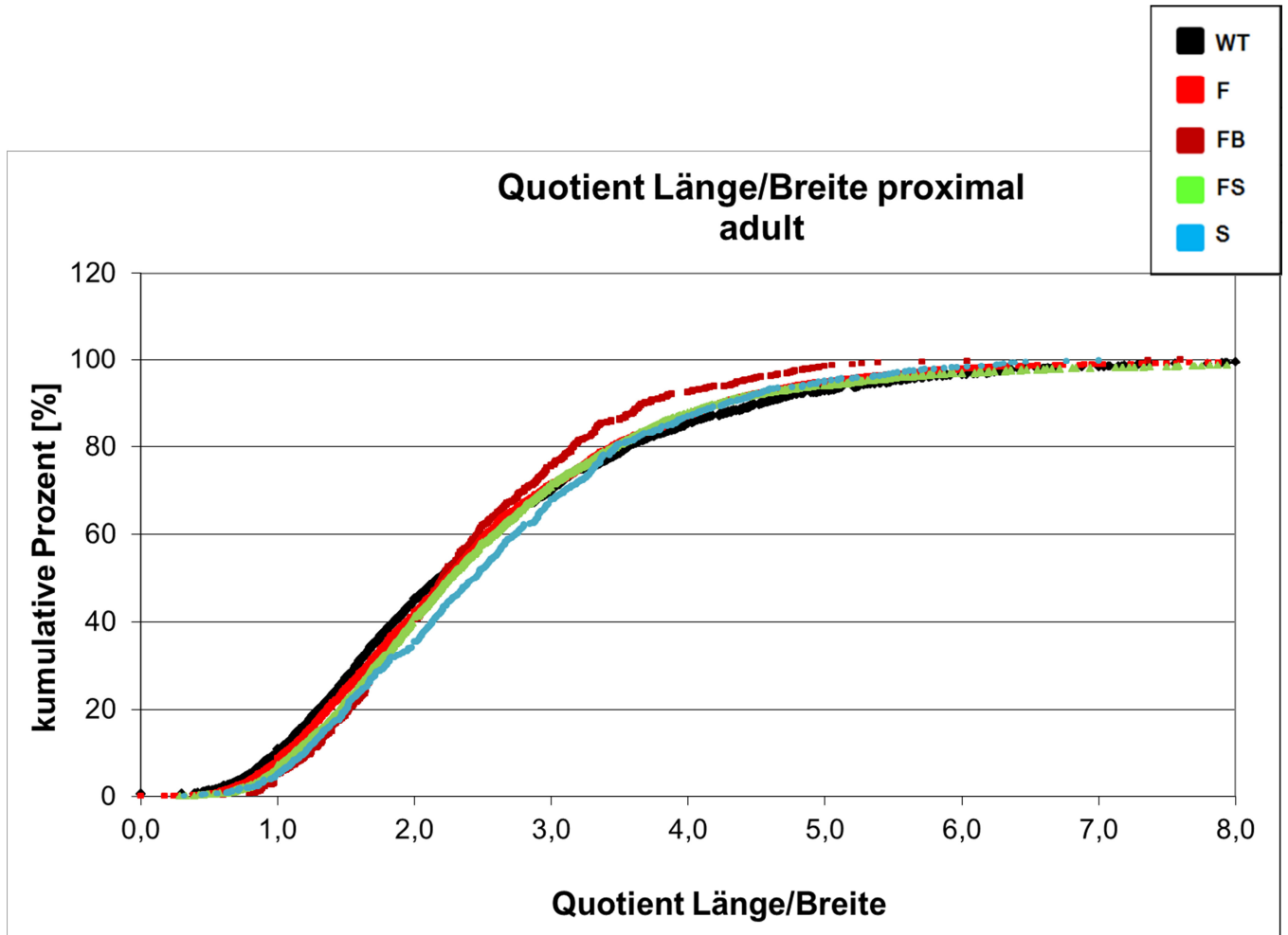












## 8 VORTRAG UND POSTER

### Vortrag

30. Treffen Norddeutscher Humangenetiker in Kiel, November 2011

“Die Rolle des Strukturproteins Shank1 in der Pathogenese des Fragilen X-Syndroms“

### Poster

31th Blankenese Conference: Nucleo-Synaptic Cross-Talk in Nerve Cells, Mai 2011

“Fragile X Mental Retardation protein regulates protein levels in postsynaptic densities”, Sabine Kramp, Janin Ölschläger-Schütt, Hans-Jürgen Kreienkamp, Dietmar Richter und Stefan Kindler

32nd Blankenese Conference: Neurodegeneration: From Multiple Sclerosis to Alzheimer’s Disease, Mai 2012

“Impact of the postsynaptic scaffold protein Shank1 on the pathogenesis of the Fragile X-Syndrome“, Sabine Kramp, Janin Ölschläger-Schütt, Hans-Jürgen Kreienkamp und Stefan Kindler

2nd International Symposium for PhD Students on Protein Trafficking in Health and Disease; September 2012

“Impact of the postsynaptic scaffold protein Shank1 on the pathogenesis of the Fragile X-Syndrome“, Sabine Kramp, Janin Ölschläger-Schütt, Hans-Jürgen Kreienkamp und Stefan Kindler

## 9 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2010 bis Januar 2013 in der Arbeitsgruppe Kindler des Instituts für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf angefertigt.

Mein Dank gilt

Prof. Dr. Andreas Gal

Prof. Dr. Dietmar Richter

PD Dr. Stefan Kindler

Dr. Janin Ölschläger Schütt

Claudia Schob

PD Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp

der Arbeitsgruppe Kreienkamp

Dr. Fabio Morellini

Dr. Michaela Schweizer

Anne Daubmann

der Arbeitsgruppe Mandelkow

der Versuchstierhaltung des UKE

Prof. Dr. Matthias Kneussel

Prof. Dr. Jutta Schneider

PD Dr. Evita Mohr

PD Dr. Sabine Lüthje

Dr. Kent Duncan

meinen Eltern und meiner Familie sowie Mario und seiner Familie.