

Funktionelle Analyse von *SHANK3*-Mutationen assoziiert mit Synaptopathien

Functional Analysis of *SHANK3* mutations associated with synaptopathies

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Victoria Isabel Martens

geboren in Jever

Hamburg, 2017

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in dem von Prof. Dr. Christian Kubisch geleiteten Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp durchgeführt. Die Doktorarbeit wurde von Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp, Frau Prof. Dr. Julia Kehr und Herrn Prof. Dr. Matthias Kneussel betreut.

Gutachter der Dissertation:

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp
2. Gutachter: Prof. Dr. Julia Kehr

Disputation: 3.2.2018

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	I
II Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Der Aufbau und die Funktionalität eines Neurons	1
1.2 Die postsynaptische Dichte	3
1.3 Die Shank-Proteinfamilie	4
1.4 Synaptopathien	6
1.4.1 Alzheimer'sche Erkrankung	6
1.4.2 Schizophrenie.....	7
1.4.3 Autismus-Spektrum-Störungen.....	7
1.5 Genetische Ursachen für Synaptopathien.....	8
1.6 Shank-Mausmodelle	9
1.7 Die Rolle der einzelnen <i>SHANK3</i> -Mutationen.....	11
1.8 Vorherige Studien identifizieren die Shank3-SPN-Domäne als Ras-assoziierte Bindedomäne	12
1.9 Allgemeine Informationen über Ras-GTPasen und ihre Rolle in Synapsen	14
2 Ziel der Arbeit	17
3 Materialien	18
3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	18
3.2 Puffer und Lösungen	18
3.3 Geräte.....	20
3.4 Kommerzielle Kits.....	22
3.5 Enzyme	22
3.6 Zellen und Gewebe	22
3.7 Medien und Medienzusätze	23
3.8 Plasmide.....	24
3.9 shRNA-Vektor.....	26
3.10 Oligonukleotide	27
3.10 Antikörper.....	28
4 Methoden	30
4.1 Molekularbiologische Methoden	30
4.1.1 Anzucht und Lagerung von E.coli	30
4.1.2 Herstellung chemisch kompetenter E.coli-Bakterien für die chemische Transformation.....	31
4.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA	31

4.1.4 Restriktionsverdau	32
4.1.5 Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	33
4.1.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	33
4.1.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	33
4.1.8 Ligation	33
4.1.9 Transformation zur Vervielfältigung von rekombinanter DNA	34
4.1.10 Sequenzanalyse von Plasmid-DNA	34
4.1.11 Polymerase-Ketten-Reaktion zur Genotypisierung von Shank3- <i>Knockout</i> -Mäusen	35
4.2 Proteinbiochemische Methoden	36
4.2.1 Herstellung von Zelllysaten	36
4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
4.3 Zellkultur	38
4.3.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen.....	38
4.3.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	38
4.3.3 Passagieren von Zellen	39
4.3.4 Präparation der postsynaptischen Dichte aus dem Gehirn adulter Mäuse.....	39
4.3.5 Immunhistochemische Analyse von Mäusen.....	40
4.3.6 Beschichtung von Mikrotiterplatten und Deckgläschen	41
4.3.7 Präparation von hippocampalen und corticalen Neuronen aus Ratten- und Mausembryonen.....	41
4.3.8 Virusproduktion	42
4.3.9 Transfektion von primären Neuronen	43
4.3.10 Nukleofektion von primären Neuronen	43
4.3.11 Transduktion von primären Neuronen	44
4.3.12 Immunzytochemie.....	44
4.3.13 Mikroskopie	45
4.3.14 Quantitative Analyse und Statistik.....	45
4.3.15 Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) mittels Mikroskopie	45
4.3.15 Durchflusszytometrie	45
5 Ergebnisse	47
5.1 Kolokalisation von Shank3 und HRas in hippocampalen Neuronen	47
5.2 Interaktionsstudie von Shank3 und kleinen G-Proteinen	48
5.2 Etablierung eines Systems zur spezifischen Aktivierung des Ras-Proteins an der Synapse	53

5.3 Untersuchung des Einflusses der Rap-Aktivierung auf die Lokalisation von Shank3 in hippocampalen Neuronen	56
5.4 Untersuchung von Konformationsänderungen im N-terminalen Bereich von Shank3..	58
5.5 Untersuchung der Proteinmenge von Ras-Proteinen in der postsynaptischen Dichte bei Verlust von Shank3	62
5.6 Analyse der Ras-vermittelten MAPK- und PI3K-Signalwege bei Verlust von Shank3	63
5.7 Identifizierung von Shank3 als Negativregulator des kleinen G-Proteins Rap	65
6 Diskussion	72
6.1 Zellbiologischer Nachweis der Interaktion zwischen Shank3 und kleinen GTPasen ...	73
6.1.1 Subzelluläre Lokalisation und Interaktion von Shank3 und kleinen G-Proteinen...	73
6.2 Funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen Shank3 und kleinen G-Proteinen....	75
6.2.1 Etablierung von Systemen zur gezielten Aktivierung von Ras und Rap	75
6.2.2 Zellbiologischer Nachweis der intramolekularen Bindung zwischen SPN- und ARR-Domäne	77
6.2.3 Einfluss der Shank3-Expression auf Rekrutierung von Ras-Proteinen an die Synapse und auf Ras-vermittelte Signalwege	78
6.3 Identifizierung von Shank3 als Negativregulator für die Integrinaktivierung mittels direkter Bindung an Rap1	80
6.4 Ausblick.....	83
7 Zusammenfassung/Summary	85
7.1 Zusammenfassung	85
8.2 Summary.....	87
9 Sicherheit und Entsorgung	89
Literaturverzeichnis	90
Abbildungsverzeichnis	110
Tabellenverzeichnis	112
Danksagung	113
Lebenslauf	115
Eidesstattliche Erklärung	118

II Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
8-CPT	8-(4-chloro-phenylthio)-2'-O-methyladenosin-3',5'-cyclisches Monophosphat
Å	Ångström
APOE	Apolipoprotein E
APP	<i>Amyloid precursor protein</i> (Amyloid-Vorläufer Protein)
ARR	<i>Ankyrin repeat region</i> (Ankyrin-Wiederholungen)
AS	Aminosäure
ASS	Autismus-Spektrum-Störungen
Aβ	Amyloid-β Protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i> (vergleichende genomische Hybridisierung)
C-Terminus	Carboxyterminus
ddNTP	Didesoxyribonucleotidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Deoxyribonukleinsäure)
DPBS	<i>Deionized Phosphate buffered Saline</i> (Deionisierte Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)

DTNBP1	Dysbindin
E. coli	Escherichia coli
EPAC	Exchange protein directly activated by cAMP
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Fötale Rinderserum)
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärts-Streulicht)
g	Erdbeschleunigung
GABA	<i>Gamma-Aminobutyric acid</i> (Gamma-Aminobuttersäure)
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GEF	Guanine nucleotide exchange factor (Guaninnukleotid-Austauschfaktor)
GFP/eGFP	<i>(enhanced) Green fluorescent protein</i> ((verbessertes) grün fluoreszierendes Protein)
GKAP	Guanylat-Kinase-assoziiertes Protein
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HEK 293 T	<i>Human embryonic kidney cells with T-Large Antigen</i> (humane embryonische Nierenzellen mit T-Large Antigen)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
IHC	Immunhistochemie
IZ	Immunzytochemie
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
L	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LRRTM1	<i>Leucine-rich repeat transmembrane</i>

	<i>neuronal protein</i>
LTD	Langzeitdepression (<i>long term depression</i>)
LTP	Langzeitpotenzierung (<i>long term potentiation</i>)
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mGluR	Metabotroper Glutamat-Rezeptor
Min.	Minute
NLG1	Neurologin
NLS	Nukleäre Lokalisations-Sequenz
nM	Nanomolar
NMDAR	N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDZ-Domäne	PSD95/Dlg1/ZO-1-Domäne (<i>Postsynaptic density protein 95/ Discs large/ zonula occludens 1 domain</i>)
PLL	Poly-L-Lysin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD	Postsynaptische Dichte
PSD-95	<i>Postsynaptic density protein of 95kDa</i>
RA-Domäne	Ras-assoziierte Domäne
Rho	<i>Ras homologue</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SAM	<i>Sterile alpha</i> Motiv
SAPAP	<i>Synapse associated protein 90/postsynaptic density-associated</i>

	<i>protein</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek.	Sekunde
SH3-Domäne	Src-Homologie 3-Domäne
Shank	<i>SH3 and ankyrin repeat domain containg</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SPN-Domäne	Shank/ProSAP N-terminale (SPN)- Domäne
SSC	<i>Side Scatter</i>
Std.	Stunde
TAO	Thousand-and-one-amino-acid
TBS-T	Tris-buffered saline-Tween20
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ubl	<i>Ubiquitin-like</i> (Ubiquitin-ähnlich)
Upm	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Der Aufbau und die Funktionalität eines Neurons

Das Neuron, welches auch als Nervenzelle bezeichnet wird, ist einer der wichtigsten Zelltypen des Nervensystems und formt zusammen mit anderen Neuronen ein komplexes Netzwerk im Gehirn (Lin & Man 2013). Es besteht aus dem Zellkörper, den Dendriten und dem Axon. Dendriten und Axone sind Zellfortsätze des Neurons, welche auch als Neuriten bezeichnet werden. Der Zellkörper des Neurons misst ungefähr 20 μm im Durchmesser und enthält den Hauptteil einer wässrigen Flüssigkeit mit zahlreichen Ionen, kleineren Molekülen und Proteinen, die als Cytosol bezeichnet wird und von der äußeren Umgebung durch die neuronale Plasmamembran abgegrenzt ist. Innerhalb des Cytosols findet man die Membranschlossenen Organellen, die auch in allen anderen Körperzellen vorkommen. Zu diesen Organellen gehören Zellkern, raues endoplasmatisches Retikulum, glattes endoplasmatisches Retikulum sowie Golgi-Apparat und Mitochondrien.

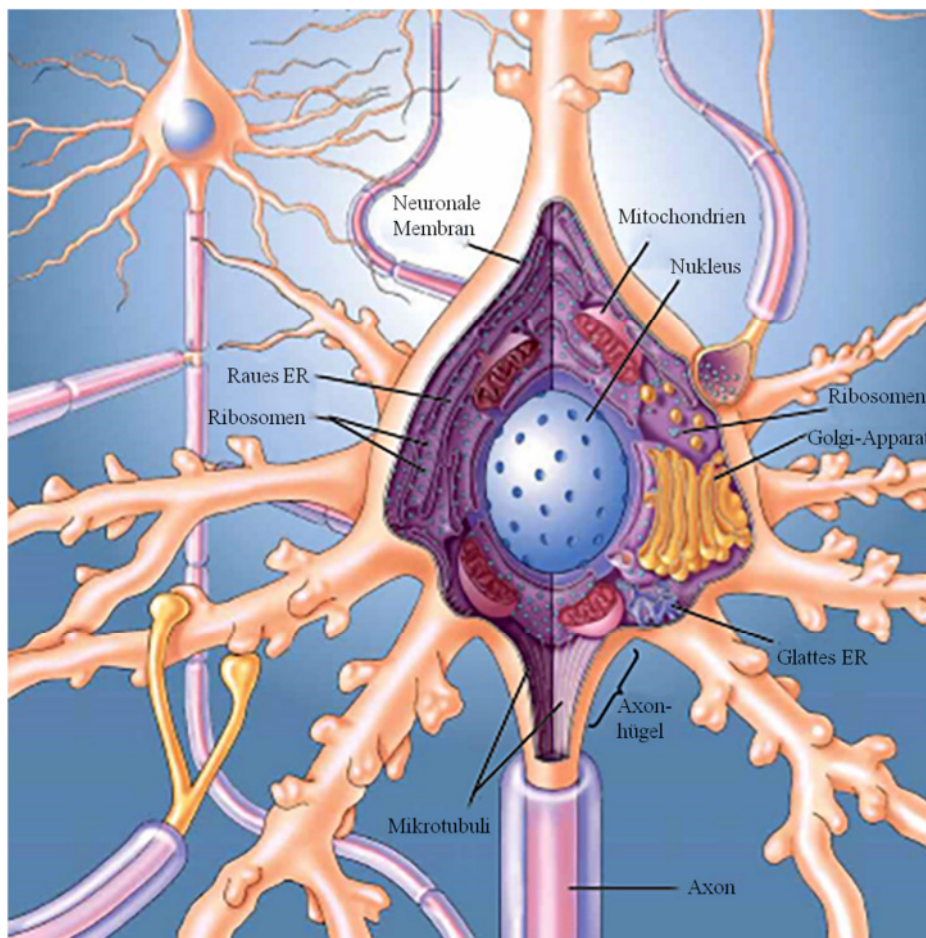


Abbildung 1 Aufbau einer Nervenzelle

(modifizierte Abbildung nach Bear, Connors, and Paradiso 2016).

Für die komplexe Morphologie eines Neurons ist das Zytoskelett essentiell; es besteht aus Mikrotubuli, Neurofilamenten und Mikrofilamenten. Mikrotubuli sind mit einem Durchmesser von 20 nm vergleichsweise groß und verlaufen longitudinal entlang der Neuriten. Die so genannten Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs, engl. *microtubuli-associated proteins*) regulieren den Aufbau der Mikrotubuli. MAPs verankern die Mikrotubuli miteinander und mit anderen Teilen des Neurons. Die Mikrofilamente hingegen haben einen Durchmesser von 5 nm, sind vor allem in den Neuriten stark ausgeprägt und bestehen aus Aktin und aktinbindenden Proteinen wie beispielsweise Fodrin (auch Spektrin genannt), Myosin und α -Actinin. Aktin ist das Hauptprotein der Mikrofilamente, und daher werden Mikrofilamente auch häufig Aktinfilamente genannt. Die polaren Aktinfilamente entstehen indem einzelne G-Aktinmonomere zu helikalen zweisträngigen F-Aktin-Filamenten polymerisieren. Jedes Aktinpolymer hat hierbei ein Plus- und Minus-Ende und kann sowohl am Plus- als auch am Minus-Ende wachsen, allerdings verläuft das Wachstum am Plus-Ende sechs- bis zehnmal schneller. Mikrofilamente verlaufen longitudinal in den Neuriten und werden bei der Bildung von Mikrofilamentbündeln von Aktin-bindenden Proteinen wie Fodrin, welche Querverbindungen zwischen den parallel verlaufenden Aktinfilamenten schaffen, unterstützt. Mikrofilamente können allerdings auch durch Aktin-bindende Proteine wie Filamin, die Querverbindungen zwischen Aktinfilamenten unterschiedlicher Orientierung schaffen, netzartige Strukturen zur Stabilisierung der Plasmamembran ausbilden. Die Aktinfilamente sind über spezifische Verankerungsproteine wie Dystrophin mit der Plasmamembran verbunden und dienen somit als mechanische Stütze der Plasmamembran. Eine weitere Komponente des Cytoskeletts sind die Neurofilamente, die man in den anderen Körperzellen als Intemediärfilamente bezeichnet. Sie haben einen Durchmesser von 10 nm und sind somit in ihrer Größe intermediär zwischen Mikrotubuli und Mikrofilamenten einzuordnen. Ein Neurofilament besteht aus mehreren Untereinheiten. Jede Untereinheit besteht aus drei Proteinsträngen, die umeinander gewunden sind.

Nachdem nun der Zellkörper und das Zytoskelett beschrieben wurden, soll nun das Axon und seine Bedeutung für die Signalweiterleitung erläutert werden. Bei dem Axon handelt es sich um einen von Gliazellen umhüllten Zellfortsatz des Neurons. Das Axon leitet einen elektrischen Nervenimpuls vom Zellkörper weg und überträgt das Signal mittels chemischer Botenstoffe auf eine weitere Zelle. Das Axon kann beim Menschen zwischen weniger als einem Millimeter oder einem Meter lang sein. Der Durchmesser ist ebenfalls sehr variabel und liegt zwischen 1-25 nm. Das Axon kann in drei Teile gegliedert werden: Axon-Anfang, -Mitte und -Ende. Das Axon beginnt mit dem Axonhügel, welcher unmittelbar aus dem

Zellkörper hervorgeht. Das anschließende kurze Segment wird als Initialsegment bezeichnet und ist nicht umhüllt. An diesem Segment kann ein Aktionspotential initiiert werden und als elektrische Erregung weitergeleitet werden. Das nächste Segment kann unterschiedlich lang sein und ist abschnittsweise von Gliazellen, die eine Myelinhülle bilden, umgeben, so dass die Signalweiterleitung schnell und effizient saltatorisch an den sogenannten Ranvier'schen Schnürringen erfolgt. Das Axon endet mit mehreren Endknöpfchen. Das Endknöpfchen ist die Kontaktstelle für die Weiterleitung von Informationen an andere Neuronen oder andere Zellen. Diese neuronale Verknüpfung nennt man Synapse. Am Endknöpfchen befindet sich eine Vielzahl von synaptischen Vesikeln, die einen Durchmesser von ungefähr 50 nm aufweisen und die Neurotransmitter beinhalten. An der Innenseite der Membran befindet sich eine Vielzahl von Proteinen und es gibt viele Mitochondrien. Die Synapsen dienen der Signalübertragung. Hierbei wird ein elektrisches Aktionspotential in ein chemisches Signal umgewandelt. Die Neurotransmitter werden als chemische Botenstoffe durch Exozytose freigesetzt und mittels Membranrezeptoren von einer anderen Zelle erkannt. Die Signale werden durch die Membranrezeptoren des Zellkörpers, des Axons oder der Dendriten erkannt. Hierbei sind die Dendriten stark verzweigte cytoplasmatische Fortsätze, die dem Zellkörper der Nervenzelle entspringen. Viele Dendriten besitzen dornartige Fortsätze (dendritische Dornen), die Postsynapsen bilden können (Bear, Connors & Paradiso 2016; Purves et al. 2004).

1.2 Die postsynaptische Dichte

Die postsynaptische Dichte (PSD) ist ein submembranöses Kompartiment, welches ein Netzwerk aus einem weiten Spektrum von ungefähr 1100 Proteinen beinhaltet und sowohl zu der Morphologie als auch zur Funktion der exzitatorischen glutamatergen Synapsen beiträgt (Coba et al. 2009; Reim et al. 2016). Bei den hier befindlichen Proteinen handelt es sich um Membranrezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle, Komponenten von Signalkaskaden, cytoskelettale Elemente und Adaptorproteine mit struktureller Funktion, die die einzelnen Komponenten der PSD zusammenhalten (Boeckers et al. 2002; Kennedy 2000; O'Brien, Lau & Huganir 1998; Ziff 1997). Viele PSD-Proteine fungieren als Gerüstproteine, die Glutamaterezeptoren und andere postsynaptische Membranproteine mit cytoskelettalen Elementen und Signalwegen verbinden (Garner, Nash & Huganir 2000; Kennedy 2000; Romorini et al. 2004; Scannevin & Huganir 2000).

1.3 Die Shank-Proteinfamilie

Eine wichtige Familie von Gerüstproteinen der postsynaptischen Dichte ist die Shank-Proteinfamilie. Die Shank-Proteinfamilie wurde 1998/1999 identifiziert und besteht aus den drei Mitgliedern Shank1, Shank2 und Shank3 (auch bekannt als CortBP1, ProSAP, Shank, SSTRIP oder Synamon) (Du et al. 1998; Naisbitt et al. 1999; Tu et al. 1999; Zitzer, Richter & Kreienkamp 1999). Die Mitglieder der Shank-Familie wurden in unterschiedlichen Bereichen des Zentralnervensystems (Boeckers et al. 2002; Brandstätter, Dick & Boeckers 2004), aber auch in nicht-neuronalen Geweben wie Thymus, endokrinen Zellen und testikulären Keimzellen nachgewiesen (Redecker et al. 2003; Redecker, Bockmann & Böckers 2006; Redecker, Gundelfinger & Boeckers 2001). Die großen Strukturproteine Shank1, Shank2 und Shank3 stellen die strukturelle und funktionale Stabilität der postsynaptischen Dichte sicher, indem sie eine Vielzahl von Proteinen mittels Protein-Protein-Interaktionsmotiven miteinander verbinden (zusammengefasst bei Sheng and Kim, 2000; Boeckers et al. 2002; Grabrucker et al., 2011; Sala et al., 2015). Die Shank-Proteine sind in der postsynaptischen Dichte in der Lage mit weiteren Strukturproteinen, ligandengesteuerten Ionenkanälen, Zelladhäsionsmolekülen wie Neuroliginen, und Proteinen, die an der dynamischen Regulation von F-Aktin beteiligt sind, zu interagieren (Kreienkamp 2008). Die Protein-Protein-Interaktionsmotive sind die SPN-Domäne (SHANK/ProSAP N-terminale Domäne), die Ankyrin-Wiederholungen (engl. *Ankyrin repeats*, ARR), eine Src-Homologie 3 (SH3) Domäne, eine PSD95/Dlg1/ZO-1 (PDZ) Domäne, eine Prolin-reiche Region und ein C-terminales *sterile alpha* Motiv (SAM). Hierbei ist anzumerken, dass die SPN-Domäne im Gehirn nur bei Shank1 und Shank3, aber nicht bei Shank2, vorkommt (Durand et al. 2012; Mameza et al. 2013; Reim et al. 2016). Bei der SPN-Domäne handelt es sich um eine hochkonservierte N-terminale Region mit ungefähr 90 Aminosäuren, die direkt N-terminal zur ARR-Domäne liegt (Alié & Manuel 2010; Durand et al. 2007; Gauthier et al. 2009). Die SPN-Domäne wurde erst vor wenigen Jahren als weitere Domäne der Shank-Familie identifiziert und funktionell untersucht (Mameza et al. 2013). Die ARR-Domäne ist hingegen gut bekannt für die Interaktion zu dem cytoskeletalen Protein α -Fodrin (Böckers et al. 2001) und dem Protein Sharpin (Lim et al. 2001), welches bei NF κ B und Integrin-abhängigen Signalwegen involviert ist (Gerlach et al. 2011; Ikeda et al. 2012; Rantala et al. 2012; Seymour et al. 2007; Tokunaga et al. 2011). Des Weiteren bindet die Rezeptortyrosin-Kinase Ret und GKAP (engl. *guanylate kinase-associated protein*, auch bekannt als SAPAP, engl. *synapse associated protein 90/postsynaptic density-associated protein*) an die PDZ-Domäne von Shank3 (Schuetz et al. 2004; Zeng et al. 2016). Darüber hinaus binden die Shank-Proteine

metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGluRs) indirekt über Homer. Die Bindung an N-methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) wird über GKAP und PSD95 vermittelt (Boeckers et al. 1999; Naisbitt et al. 1999; Sheng & Kim 2000; Tu et al. 1999; Zhou et al. 2015). Des Weiteren interagieren die Shank-Proteine auch mit einigen Aktin-regulierenden Molekülen über die Prolin-reiche Region, so z.B. mit Cortactin (Du et al. 1998; Hering & Sheng 2003; Macgillavry et al. 2016; Naisbitt et al. 1999), IRSp53 (Bockmann et al. 2002; Soltau 2002), AbP1 (Qualmann 2004) oder an der PDZ-Domäne β -PIX (Park et al. 2003). Die Shank-Proteine können auch Zink-abhängig über die SAM-Domänen als Homomer oder Heteromer miteinander binden und auf diese Art und Weise multimerisieren (beschrieben in Sheng & Kim 2000). Die Shank-Proteine bieten somit ein multivalentes Gerüst, auf dem sich die postsynaptische Dichte aufbaut (Yoo et al. 2014). Interessant ist auch die Vielzahl der Shank-Isoformen, die aufgrund des alternativen Spleißens und der Aktivität unterschiedlicher Promotoren entstehen. Das *SHANK1*-Gen hat zwei Promotoren, das *SHANK2*-Gen drei Promotoren und das *SHANK3*-Gen hat insgesamt sechs Promotoren (Jiang & Ehlers 2013). In Abbildung 2 sind alle Shank3-Isoformen bildlich dargestellt und die Bindungsstellen von bekannten Interaktionspartnern wurden kenntlich gemacht.

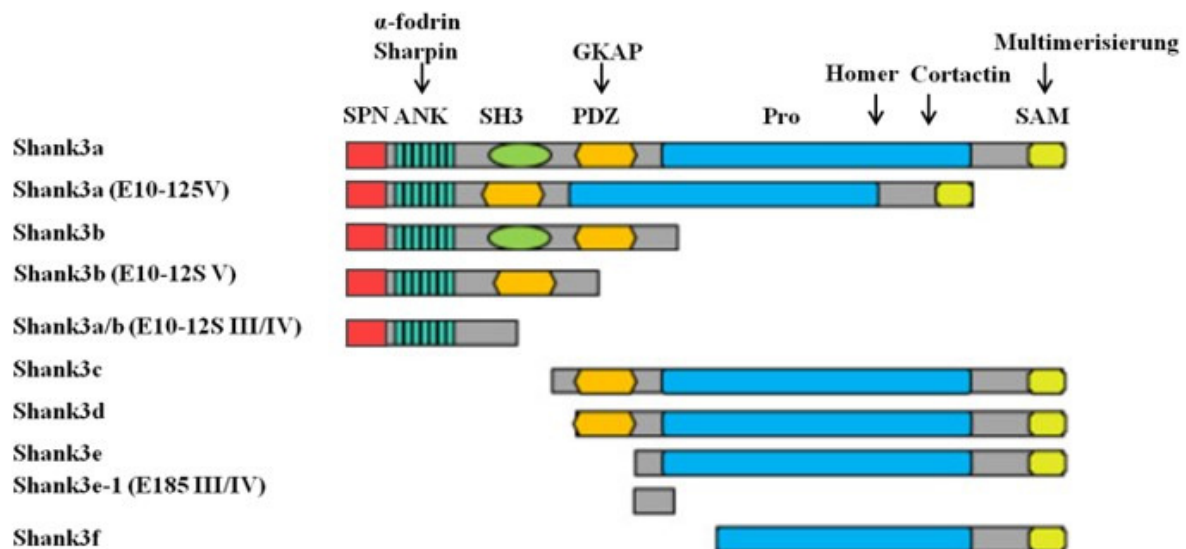


Abbildung 2 Shank3-Isoformen und Bindungsstellen bekannter Interaktionspartner.

Aufgrund der sechs Promotoren und des alternativen Spleißens entstehen die gezeigten Shank3-Isoformen. Hierbei wurden auch die Spleißvarianten in den Exons 10-12 (E10-12S) und im Exon 18 (E18S) berücksichtigt und mit römischen Ziffern nummeriert. Die Bindungsstellen von mehreren bekannten PSD-Proteinen wurden mit einem Pfeil eingezeichnet (modifiziert nach Wang et al. 2014).

Neue Studien zeigen darüber hinaus auch, dass die mRNA von allen drei Shank-Familienmitgliedern auch in dem Axon vorkommt und die Shank-Proteine dort eine wichtige Rolle beim axonalen Wachstum und der präsynaptischen Entwicklung und Funktion haben könnten (Halbedl et al. 2016).

1.4 Synaptopathien

Eine funktionierende synaptische Homöostase ist eine Grundvoraussetzung für ein gesundes Gehirn. Dementsprechend gibt es Erkrankungen des Nervensystems, die auf eine Fehlfunktion der Synapsen zurückzuführen sind. Hierbei sind die synaptische Morphologie und Funktion gestört. Bei diesen Erkrankungen spricht man von Synaptopathien. Zu diesen Erkrankungen gehören die Alzheimer'sche Erkrankung, Schizophrenie und Autismus-Spektrum-Störungen. Interessanterweise konnten in mehreren Studien festgestellt werden, dass die postsynaptischen Shank (SH3 and *ankyrin containing*)-Proteine eine Rolle bei allen bereits genannten Erkrankungen spielen (Grabrucker et al. 2011a). Bei der Alzheimer'schen Erkrankung konnte festgestellt werden, dass es zu einem Verlust des Shank3-Proteins an den Synapsen kommt (Gong et al. 2009), während bei Patienten mit intellektuellen Einschränkungen, Schizophrenie oder Autismus-Spektrum-Störungen Mutationen des *SHANK3*-Gens identifiziert wurden (Cochoy et al. 2015).

1.4.1 Alzheimer'sche Erkrankung

Die Alzheimer'sche Erkrankung ist eine neurodegenerative Erkrankung, bei der es zu einer zunehmenden Verschlechterung der kognitiven Leistungsfähigkeit kommt; dies führt in der Regel zur Demenz. Die Neurodegeneration führt zu einem Verlust von Neuronen und Synapsen (DeKosky, Aston & Kamboh 1996). Mehrere Studien legen nahe, dass dieser Verlust durch die erhöhten Mengen an Amyloid- β -Protein, einem Abbauprodukt des Amyloid-Vorläufer-Proteins (*engl. Amyloid precursor protein, APP*) zustande kommt (Selkoe 1989, 1993; Sisodia & Price 1995). Allerdings waren die Mechanismen, durch die die Amyloid- β -Akkumulation zum Verlust der Synapsen führt, lange Zeit vollkommen ungeklärt. Interessanterweise wurde bei Modellen für Alzheimer und bei Alzheimer-Patienten auch eine Dysregulation der Shank-Proteine festgestellt. Mehrere Studien zeigen, dass der Abbau der Shank3-Proteine zu der molekularen Pathologie der Alzheimer'schen Erkrankung beiträgt (Baron et al. 2006; Boeckers 2006; Gong et al. 2009). Der Verlust der Synapsen geht einher mit dem Zusammenbruch der postsynaptischen Dichte. Des Weiteren wurde gezeigt, dass A β -Oligomere fortschreitend im Gehirn von Alzheimer-Patienten und bei APP-transgenen Mäusen akkumulieren und gleichzeitig die synaptischen Gerüstproteine Shank1 und Shank3 in reduzierter Menge vorliegen (Gong et al. 2009; Pham et al. 2010). Da die Anordnung der Shank3-Proteine von Zink-Ionen abhängig ist (Baron et al. 2006; Jan et al. 2002) und das Amyloid- β -Protein (A β) fähig ist, Zink-Ionen zu binden (Bush et al. 1994), wird vermutet,

dass die Sequestrierung der Zink-Ionen zu der Fehlfunktionalität der Shank-Plattform beiträgt (Grabrucker et al. 2011a, 2011b).

1.4.2 Schizophrenie

Die Schizophrenie ist ebenfalls eine Synaptopathie. Es handelt sich um eine komplexe mentale Störung, bei der eine Störung der Wahrnehmung, des Denkens, des Antriebs und der Psychomotorik vorliegt. Die Symptome dieser Erkrankung manifestieren sich meist im jungen Erwachsenenalter. Die Diagnose beruht auf Verhaltensanalysen und Erfahrungsberichten. Als Ursachen dieser Erkrankung werden Fehler der Synapsenbildung, Störungen der Signalweiterleitung und eine Störung des Gleichgewichts zwischen erregenden und hemmenden Synapsen vermutet (van Os & Kapur 2009; Peykov et al. 2015; Picchioni & Murray 2007; Tandon, Nasrallah & Keshavan 2009). Es wurden zahlreiche genetische Auffälligkeiten bei Schizophrenie und Autismus-Spektrum-Störungen identifiziert, die in dem Abschnitt 1.5 Genetische Ursachen für Synaptopathien“ näher beleuchtet werden.

1.4.3 Autismus-Spektrum-Störungen

Bei den Autismus-Spektrum-Störungen handelt es sich um tiefgreifende neurologische Entwicklungsstörungen, bei der die Patienten soziale Defizite, Störungen bei der Sprachentwicklung, Schwierigkeiten bei der Kommunikation und repetitive, begrenzte Verhaltensmuster aufweisen (Yoo et al. 2014). Man unterscheidet zwischen autistischer Störung, Asperger Syndrom, einer desintegrativen Störung im Kindesalter und einer nicht weiter spezifizierten tiefgreifenden Entwicklungsstörung. Begleiterkrankungen, die häufig bei Autismus-Spektrum-Störungen auftreten, sind Hyperaktivität, Zwangsstörungen, Angststörungen, Hypotonie, Epilepsie, Schlafstörungen und gastrointestinale Erkrankungen (Gillberg & Billstedt 2000; Levy, Mandell & Schultz 2009; Yoo et al. 2014). Effektive Therapien für Autismus-Spektrum-Störungen wurden bisher nicht entwickelt. Die Patienten werden verhaltenstherapeutisch behandelt. Medikamente wie beispielsweise Risperidon oder Aripiprazol werden nur bei aggressiven Verhaltensauffälligkeiten oder auffälliger Reizbarkeit verabreicht. Des Weiteren gibt es auch ergänzende und alternative medizinische Ansätze, bei denen beispielsweise die Ernährung umgestellt, oder eine Bewegungs- oder eine musikalische Therapie durchgeführt wird (Brondino et al. 2015). Es sind 1% der Bevölkerung von Autismus-Spektrum-Störungen betroffen. Männer sind vier Mal häufiger als Frauen betroffen (Durand et al. 2012).

1.5 Genetische Ursachen für Synaptopathien

Die genetischen Ursachen für Synaptopathien sind vielfältig. Bei der Alzheimer'schen Erkrankung unterscheidet man zwischen der Alzheimer'schen Erkrankung im jüngeren und älteren Lebensalter. Die Alzheimer'sche Erkrankung im jüngeren Lebensalter betrifft 1-6% der Fälle und die Symptome treten zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr auf. Bei der Alzheimer'schen Erkrankung im älteren Lebensalter treten die ersten Symptome erst mit ungefähr 60 Jahren oder später auf. Bei ungefähr 60% der Fälle von Alzheimer im frühen Lebensalter gibt es mehrere Fälle von Alzheimer'schen Erkrankungen in der Familie, und in 13% dieser Fälle wurde eine autosomal-dominante Vererbung nachgewiesen, die mindestens drei Generationen betraf (Brickell et al. 2006; Campion et al. 1999). Hierbei ist anzumerken, dass beide Formen der Alzheimer'sche Erkrankung in der gleichen Familie auftreten können (Bird 2009). Zwillingsstudien unterstützen die Existenz einer genetischen Komponente bei der Alzheimer'schen Erkrankung im späten Lebensalter, allerdings konnte bisher kein ursächliches Gen eindeutig identifiziert werden. Das einzige Gen, welches konsistent assoziiert ist mit dem Auftreten der Alzheimer'schen Erkrankung im späten Lebensalter ist das *APOE*-Gen, welches für das Apolipoprotein E kodiert (Bird 2009; Chai 2007; Daw et al. 2000). Allerdings gibt es auch viele Träger des *APOE* ϵ 4-Risikoallels, die 90 Jahre und älter sind und keine Symptome zeigen; dies lässt vermuten, dass es auch weitere genetische und umweltbedingte Risikofaktoren für die Alzheimer'sche Erkrankung gibt. Weitere Alzheimer-assoziierte Gene kodieren für das Amyloid-Vorläuferprotein, Presenilin1 und Presenilin 2 (Bekris et al. 2014).

Bei Patienten, bei denen Schizophrenie diagnostiziert wurde, wurden bisher einige Genveränderungen identifiziert (Greenwood et al. 2012; Sun et al. 2008; Zhao et al. 2013). Viele dieser Kandidatengene kodieren für Proteine, die eine zentrale Rolle bei der synaptischen Funktion spielen; zu diesen Proteinen gehören Dysbindin (*DTNBPI*) (Straub et al. 2002), Neuregulin (*NLG1*) (Stefansson et al. 2002), Shank1 (Lennertz et al. 2012), Shank3 (Gauthier et al. 2010), Proteine der Synaptotagmin-Familie und das neuronale Transmembranprotein *LRRTM1* (engl. *Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein*) (Inoue et al. 2007; Ludwig et al. 2009; Takashima et al. 2011). Es wurde in mehreren Studien ein Zusammenhang von Schizophrenie und der chromosomalen Region 22q11-13 festgestellt (Condra et al. 2007; DeLisi et al. 2002; Karayiorgou et al. 1995; Mowry et al. 2004). In diesem Bereich liegt auch das *SHANK3*-Gen, und *SHANK3*-Mutationen wurden als einer der

genetischen Faktoren für Schizophrenie identifiziert. Die Rolle der einzelnen *SHANK3*-Mutationen wird in Abschnitt 1.7 (siehe S. 11) weiterführend erläutert.

Familien- und Zwillingsstudien deuten daraufhin, dass es für Autismus-Spektrum-Störungen ebenfalls eine starke genetische Grundlage gibt. Dadurch dass die Genomsequenzierungstechnologie sich in den letzten Jahren stark entwickelt hat, wurden zahlreiche *de novo* oder vererbte Mutationen von bestimmten Genen bei Patienten mit Autismus-Spektrum-Störungen identifiziert. Allerdings sind die genauen Mechanismen, die zu diesem Krankheitsbild führen, weitestgehend unklar (Kelleher et al. 2012; Pinto et al. 2010; Rosti et al. 2014; Sato et al. 2012; Wöhr 2014; Yoo et al. 2014). In ungefähr 20% der Fälle konnte eine genetische Auffälligkeit festgestellt werden, welche in 90% der Fälle vererbt worden ist (Rosti et al. 2014; Sandin et al. 2014). Eines der zentralen Ziele der Forschung im Bereich der Autismus-Spektrum-Störungen ist es die spezifischen neuronalen Entwicklungsmechanismen zu identifizieren, die diese Erkrankungen verursachen, und die sichtbaren autistischen Anzeichen und Symptome auf molekularer Ebene zu erklären (Verhoeff 2015). Es sind in mehreren Fällen Gene betroffen, die für synaptische Proteine kodieren; insofern scheint ein gemeinsamer Mechanismus von entscheidender Bedeutung für die Entstehung dieser Krankheit zu sein (Arons et al. 2012; Kelleher et al. 2012). Die identifizierten Mutationen kodieren für synaptische Proteine wie Neurexin, Neuroligin, PSD95, Shank3, Synapsin, Gephyrin, Cadherin, Photocadherin, TAO (engl. *thousand-and-one-amino-acid*) 2 Proteinkinase, Contactin, GABA- (engl. *Gamma-Aminobutyric acid*) Rezeptoren und Glutamatrezeptoren (Chen et al. 2014). Eine Haploinsuffizienz des *SHANK3*-Gens aufgrund einer *de novo* Mutation bzw. Deletion wurde in mehreren humangenetischen Studien in Zusammenhang mit Autismus gebracht (siehe hierzu auch Abschnitt 1.7, S.11) (Betancur & Buxbaum 2013; Bonaglia et al. 2001; Durand et al. 2007; Sebat et al. 2007; Wes et al. 2014) und durch Untersuchungen von Mausmodellen bestätigt (Bozdagi et al. 2010; Duffney et al. 2015; Kouser et al. 2013; Peça, Ting & Feng 2011; Schmeisser et al. 2012; Wang et al. 2011).

1.6 Shank-Mausmodelle

Bei Mäusen, denen Shank-Proteine fehlen, können ähnliche Symptome wie bei Autismus-spektrum-Störungen (ASS) festgestellt werden. *Shank1-Knockout*-Mäuse zeigen ein erhöhtes Angstverhalten, verringerte vokale Kommunikation, verringerte Beweglichkeit und eine erstaunlich gesteigerte Leistung des Arbeitsgedächtnisses, aber eine reduzierte Leistungsfähigkeit des Langzeitgedächtnisses (Hung et al. 2009; Silverman et al. 2012; Wöhr

et al. 2011). Shank2-Knockout-Mäuse zeigen hingegen Hyperaktivität, ein erhöhtes Angstverhalten, eine sich häufig wiederholende Fellpflege und Anomalien in vokalem und sozialem Verhalten (Schmeisser et al. 2012; Won et al. 2012). Shank3-Knockout-Mäuse zeigen Defizite in sozialen Interaktionen und der Kommunikation (Leblond et al. 2014). Es wurden verschiedene Shank3-Knockout-Mäuse von Bozdagi et al., Wang et al., Yang et al., Peça et al. und Schmeisser et al. generiert (Bozdagi et al. 2010; Lee et al. 2015; Peça et al. 2011; Schmeisser et al. 2012; Wang et al. 2011; Yang et al. 2012). Abhängig von der untersuchten Shank3-Deletion sind die Auffälligkeiten der Shank3-Knockout-Mäuse recht unterschiedlich und geben Hinweise auf die Funktion der einzelnen Shank3-Varianten. Nicht alle Mauslinien zeigten klare Defizite in sozialen Interaktionen. Der bei allen Shank3-Mausmodellen konsistente Phänotyp war die repetitive, häufig ausgeführte Fellpflege, die zum Teil zu Verletzungen führt. Aufgrund der besonderen Relevanz für diese Arbeit wird die von Schmeisser et al. generierte Shank3 $\alpha\beta^{-/-}$ -Maus näher beschrieben. Dieser Shank3-defizienten Maus fehlen aufgrund einer Deletion im Exon, welches für die SH3-Domäne kodiert, die größeren Shank3-Isoformen. Des Weiteren konnte bei dieser Maus festgestellt werden, dass sowohl Shank1 als auch Shank2 hochreguliert in der postsynaptischen Dichte vorkommen, während die bekannten Shank3-Interaktionspartner GKAP/SAPAP und PSD95 nicht verändert sind. Die NMDA-Rezeptor-Untereinheit GluN2B ist ebenfalls in der postsynaptischen Dichte hochreguliert. Die Länge und Dicke der postsynaptischen Dichte wurde ebenfalls von Schmeisser et al. untersucht und zeigte keine Auffälligkeiten. Die repetitiv häufig ausgeführte Fellpflege ist auch bei der von Schmeisser et al. generierten Shank3-Knockout-Maus sehr gut zu sehen (Schmeisser et al. 2012). Weiterhin ist auch interessant, dass es auch erste Studien anhand der Shank3-Knockout-Mauslinien gibt, die den autistischen Phänotyp dieser Mäuse reduzieren. Bei der von Peça et al. generierten Shank3-Knockout-Mauslinie konnte festgestellt werden, dass die Menge an Aktinfilamenten im Cortex reduziert ist (Peça et al. 2011). Durch die Regulation von Aktinregulatoren mittels Inhibition von Cofilin und Aktivierung von Rac konnte der autistische Phänotyp der Shank3-defizienten Maus gemildert werden. Dies könnte ein Ansatz für eine medikamentöse Therapie von Patienten mit Autismus sein (Duffney et al. 2015). Eine weitere Studie zeigt, dass die pharmakologische Stimulation des mGlu5-Rezeptors wirksam die autistische Verhaltensweise von Shank3^(e11)-Knockout-Mäusen behandelt (Vicidomini et al. 2016). Darüberhinaus konnte von Mei et al. anhand einer konditionalen Shank3-Knock-in Maus festgestellt werden, dass die Re-Expression von Shank3 zu einer Verbesserung der synaptischen Proteinzusammensetzung, Dichte der dendritischen Dornen und neuronalen Funktion im

Striatum führte (Mei et al. 2016). Diese Daten weisen daraufhin, dass es mehrere Möglichkeiten gibt, Shank3-basierte Erkrankungen bei Erwachsenen zu behandeln.

1.7 Die Rolle der einzelnen *SHANK3*-Mutationen

Schizophrenie und Autismus-Spektrum-Störungen sind zwei unterschiedliche Störungen, die allerdings einige gemeinsame Pathologien und Symptome aufweisen. Bei Patienten mit Schizophrenie oder Autismus-Spektrum-Störungen wurden insbesondere bei Genen, die mit der synaptischen Entwicklung, Funktion und Plastizität verbunden sind, häufig Mutationen identifiziert. So ist das *SHANK3*-Gen bei beiden Erkrankungen ein Risiko-Gen. Ein Beispiel für eine *SHANK3*-Mutation, die bei einem Patienten mit Schizophrenie identifiziert wurde, ist die Mutation R1117X, welche aufgrund der C-terminalen Deletion zu einem trunkeierten Shank3-Protein führt, welches nicht in der postsynaptischen Dichte vorkommt, sondern innerhalb des Nukleus akkumuliert. Die nukleäre Lokalisation des mutierten Shank3-Proteins verändert die Transkription von mehreren Genen, unter anderem die zuvor schon als genetische Risikofaktoren charakterisierten Gene, welche für Synaptotagmin1 und LRRTM1 kodieren, welche bei Auftreten der Mutation R1117X hochreguliert vorliegen. Des Weiteren führt die Expression der Schizophrenie-assoziierten Mutante ähnlich wie bei einem Knockdown von Shank3 zu einer reduzierten Synapsen-Dichte bei neuronalen Kulturen. Des Weiteren ist die R1117X-Mutation in Kultur mit einem veränderten Verhältnis von exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen und einer verminderten dendritischen Verzweigung verbunden (Grabrucker et al. 2014).

Bei Patienten, bei denen Autismus-Spektrum-Störungen diagnostiziert wurden, wurden zahlreiche *SHANK3-missense* Mutationen identifiziert. Die Domänenstruktur von Shank3 und die einzelnen Mutationen, welche mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziiert sind, sind in Abbildung 3 gezeigt.

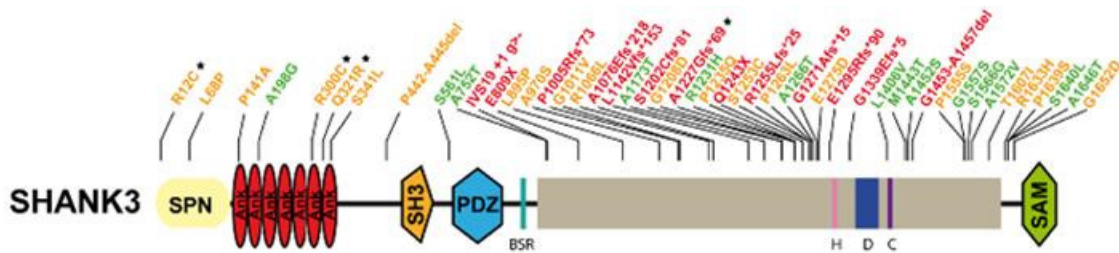


Abbildung 3 Domänenstruktur des Shank3-Proteins und SHANK-Varianten in Patienten mit Autismus-Spektrum-Störungen.

Es wurden mehrere Mutationen bei Patienten mit synaptischen Erkrankungen identifiziert. Anhand dieses Schemas wird gezeigt, welche Domänen von den jeweiligen Mutationen betroffen sind. Mutationen, die zur Expression von verkürzten Shank3-Proteinen führen, sind rot markiert. Mutationen, die anhand eines Modells vermutlich zu einer Deletion führen sind rot markiert, und Mutationen, die vermutlich keinen Effekt haben, wurden grün markiert. Kodierende Sequenz-Varianten, die in vitro nachweislich eine funktionelle Störung zeigten, wurden mit schwarzen Sternchen gekennzeichnet. Die konservierten Domänen wurden farblich markiert: SPN (gelb), Ankyrin (rot), SH3 (orange), PDZ (blau) und SAM (grün) (modifizierte Abbildung von Leblond et al. 2014).

Besonders auffällig bei der von Leblond et al. durchgeführten Meta-Analyse von *SHANK3*-Mutationen ist, dass die mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziierten Mutationen hauptsächlich die SPN-Domäne, die Ankyrin-Region und die prolin-reiche Region betreffen. Über die molekularen Auswirkungen der einzelnen Mutationen ist in den meisten Fällen nur wenig bekannt.

1.8 Vorherige Studien identifizieren die Shank3-SPN-Domäne als Ras-assoziierte Bindedomäne

In Kooperation mit Prof. Dr. Igor Barsukov (Liverpool, England) wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp die dreidimensionale Struktur der N-terminalen Shank3 SPN-ARR-Region aufgeklärt. Hierfür wurde das N-terminale Fragment (Aminosäuren 1-348) kristallisiert und die Struktur mittels Molekular-Ersatz-Technik gelöst. Die Auflösung dieser Struktur liegt bei 2,2 Å. Die Struktur zeigt, dass das SPN-ARR-Fragment aus zwei deutlich abgegrenzten Domänen besteht, die durch eine 19 Aminosäure-lange *Linker*-Region verbunden sind. Die ARR-Domäne besteht aus sieben Helix-Turn-Helix- β -Haarnadel Ankyrin-Wiederholungen. Die SPN-Domäne (Aminosäuren 8-93) hat eine Ubiquitin-ähnliche (*engl. ubiquitin like*, Ubl) Faltung, welche sehr stark der F₀-Domäne von Talin ähnelt. Der N-terminale Bereich der *Linker*-Region, welcher SPN und ARR-Domänen miteinander verbindet, verläuft entlang der ARR- β -Haarnadel-Oberfläche und geht mehrere polare Kontakte mit SPN- und ARR-Domäne ein (siehe hierzu Abbildung 4C). Der C-terminale Bereich der *Linker*-Region faltet hingegen zu einer zweifach gewundenen alpha-Helix-Struktur und schließt sich an die ARR-Domäne an. Aufgrund der Ähnlichkeit der SPN-Region mit der Talin-F₀-Struktur und der bekannten Interaktion zwischen Talin-F₀ und Rap1

wurde weiterhin untersucht, ob es sich bei der SHANK SPN-Domäne um eine Ras-assoziierte (RA) Domäne handelt, die mit Ras und Rap GTPasen interagieren kann. Ein Vergleich mit den RA-Domänen von RalGDS, Raf und Byr zeigte, dass die für die Ras/Rap-Erkennung wichtigen positiven Ladungen (Aminosäuren Arg12 und Lys22) in den β 1- und β 2-Strängen von Shank3 vorkommen und eine klare Verteilung von hydrophoben Aminosäure-Resten vorliegt, wie sie typischerweise bei RA-Domänen vorkommt. Somit weisen diese Daten deutlich daraufhin, dass die SHANK3-SPN-Domäne zu der Familie der RA-Domänen von Ubl-Domänen gehört (siehe Abbildung 4).

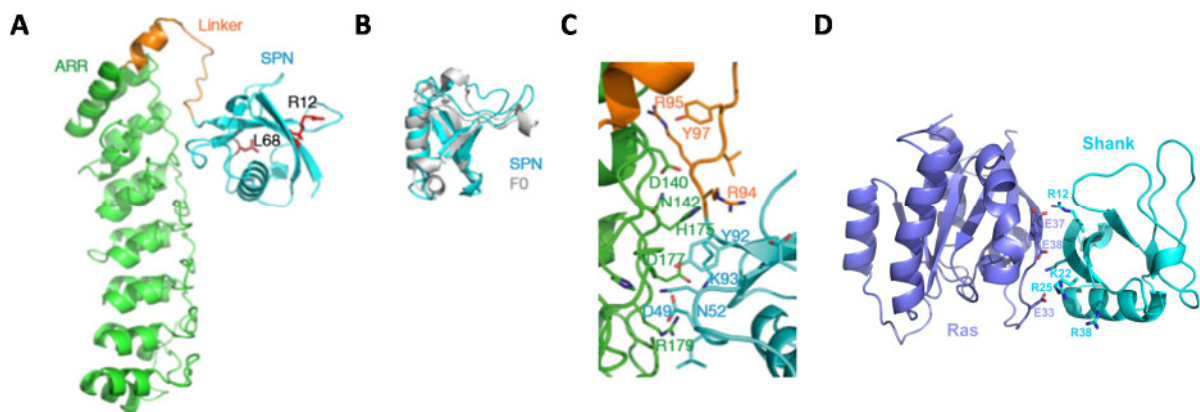


Abbildung 4 Drei-dimensionale Struktur der Shank3 SPN-ARR Region.

A Schematische Repräsentation der SPN-ARR Kristallstruktur zeigt die SPN-Domäne in Cyan, die Linker-Region in Orange und die ARR –Domäne in Grün. Die Seitenketten der Aminosäuren Arg12 und Leu68 wurden in Patienten mit Autismus-Spektrum-Störungen mutiert gefunden und sind hier rot gekennzeichnet. **B** Überlagerung der SHANK3-SPN-Domäne (Cyan) und der F0-Domäne von Talin (Grau). **C** Die Seitenketten von verbindenden Aminosäureresten sind bei der Verbindungsstelle zwischen SPN- und ARR-Domäne gekennzeichnet. **D** Das Modell für den Ras-Shank3 SPN-Komplex.

Weiterhin zeigte die Arbeitsgruppe Kreienkamp in Immunpräzipitationsexperimenten, dass die SHANK3-SPN-Domäne an die WT- und konstitutiv aktive (G12V)-Form von HRas, aber nicht an die dominant-negative HRas-S17N-Variante bindet. SHANK3 bindet also bevorzugt an die GTP-gebundene, aktive Form von HRas. Darüberhinaus bindet die SPN-Domäne auch an einige andere Ras- und Rap-Proteine; hierzu gehören KRas, RRas, NRas, Rap1a und Rap1b. Hinzuzufügen ist, dass keine Interaktion von Shank3-SPN mit den Rho G-Proteinen, Rac1 oder Cdc42, nachgewiesen wurde. Anhand von Strukturanalysen wurde vorhergesagt, dass die mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziierten Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C zu einer reduzierten Ras-Bindungsfähigkeit führen würden. Mittels Immunpräzipitation konnte bestätigt werden, dass aufgrund dieser beiden Shank3-Mutationen weder Ras- noch Rap-Varianten gebunden werden können (Lilja, J. et al. 2017).

1.9 Allgemeine Informationen über Ras-GTPasen und ihre Rolle in Synapsen

Ras und Rap sind eng-verwandte Mitglieder der Ras-Superfamilie von kleinen GTPasen und fungieren beide als molekulare Schalter zwischen GDP-gebundener inaktiver und GTP-gebundener aktiver Form. Das Ras-Protein ist hierbei ein universell eukaryotisches intrazelluläres, membran-verankertes 21 kDa- großes Protein und reguliert wichtige Signalwege wie beispielsweise den Ras/Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg (Serchov et al. 2015). Die drei Ras-Isoformen KRas, NRas und HRas werden von drei verschiedenen Genen codiert und ubiquitär in Säugetieren exprimiert (Hancock 2003). Die Ras-Aktivität hängt von der Verankerung in der Plasmamembran mittels eines Plasmamembran-Zielmotivs ab. Dieses Motiv ist Teil der C-terminalen hypervariablen Region, welche signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Ras-Isoformen aufweist. Alle drei Ras-Isoformen haben eine CAAX-Sequenz am C-Terminus, welche die Farnesylierung und weitere Prozessierung des Cystein-Restes spezifiziert. Die Sequenz von KRas enthält eine zusätzliche polybasische Region neben der CAAX-Box, während Hras und NRas stattdessen palmitoylierte Reste aufweisen. Es wird vermutet, dass diese Unterschiede eine Rolle bei der Generierung von unterschiedlichen Signalantworten spielen, indem die subzelluläre Lokalisierung oder Micro-Lokalisierung innerhalb der Plasmamembran unterschiedlich reguliert wird (Chiu et al. 2002; Prior et al. 2001). Zusätzlich zu der essentiellen Rolle bei der Regulierung von Zellwachstum und -differenzierung, wurden Ras-Signalwege verknüpft mit einem großen Bereich von neuronalen Funktionen inklusive synaptischer Plastizität und Verhalten (Fivaz & Meyer 2005; Thomas & Huganir 2004). Pharmakologische und genetische Manipulation von Mitgliedern der Ras/MAPK-Signalkaskade haben gezeigt, dass dieser Signalweg eine Rolle bei der synaptischen Plastizität spielt (Cristo 2001; Huang, Martin & Kandel 2000; Kelleher et al. 2004; Wu, Deisseroth & Tsien 2001). So sind die kleinen G-Proteine essentielle Modulatoren der synaptischen Stärke und Struktur während der NMDAR-abhängige Langzeitpotenzierung (LTP) sind (Qin et al. 2005; Wiens 2005; Xie et al. 2008; Zhu et al. 2002). Der Ras/ERK-Signalweg beeinflusst die Rekrutierung von AMPA-Rezeptoren zu den dendritischen Dornen, die bei der LTP-Induktion erfolgt (Kim et al. 2005; Patterson, Szatmari & Yasuda 2010; Thomas & Huganir 2004; Zhu et al. 2002). Die Aktivität von Ras wird von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF, engl. *Guanine nucleotide exchange protein*) und GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) reguliert. Hierbei induzieren GEFs den Austausch des in der inaktiven Form gebundenen GDP durch GTP; dies führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, so dass Effektorproteine binden und aktiviert werden können. Aktivierte kleine G-

Proteine kehren in den GDP-gebundenen Zustand durch Hydrolyse des GTPs, die durch GAPs unterstützt wird, zurück (Raaijmakers & Bos 2009). Besonders interessant ist hierbei SynGAP, ein Ras-GTPase-aktivierendes Protein, welches hoch-angereichert an exzitatorischen Synapsen im Gehirn vorkommt (Araki et al. 2016). SynGAP interagiert mit den PDZ-Domänen von PSD-95 und SAP102. Es kommt in einem großen makromolekularen Komplex mit PSD95, SAP102 und dem NMDA-Rezeptor vor und stimuliert die intrinsische GTPase-Aktivität von Ras. Somit reguliert dieses Protein die synaptische Ras-Signaltransduktion (Kim et al. 1998). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass Guanin-Austauschfaktoren eine kritische Rolle bei der Regulation von kleinen GTPase wie Rap spielen und die Morphologie von dendritischen Dornen beeinflussen (Penzes, Woolfrey & Srivastava 2011). Ein Beispiel hierfür ist Epac2 (engl. *exchange protein directly activated by cAMP*, cAMP-GEFII and RapGEF4), ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF, guanine nucleotide exchange factor) für Rap. Epac2 fördert in seiner aktiven Form die Bildung von dünnen dendritischen Dornen und die Endozytose von AMPA-Rezeptoren und ist für die Langzeitdepression (LTD, engl. *long-term depression*), Depotenzierung, Langzeitpotenzierung und das räumliche Gedächtnisvermögen erforderlich. Es handelt sich um ein Signalprotein, welches in der postsynaptischen Dichte des Vorderhirns nachgewiesen wurde. Es gibt zwei Gene, die für Epac-Proteine kodieren: EPAC1 und EPAC2 (Gloerich & Bos 2010). Epac2 ist die größere Isoform und im Gehirn und den Nebennieren zu finden, während Epac1 in den meisten nicht-neuronalen Geweben und kaum im adulten Gehirn exprimiert wird. Epac2 enthält eine Rap-GEF-Domäne und zwei cAMP-Bindedomänen, von denen allerdings nur eine funktionell zu sein scheint. Die Bindung von cAMP induziert die GEF-Aktivität von Epac gegenüber Rap1 und Rap2. Durch das cAMP-Analogon 8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosin-3',5'-cyclisches Monophosphat (8-CPT) kann in vitro gezielt die Rap-Aktivität in neuronalen Zellen induziert werden und die Effekte von Rap-vermittelten Signalwege untersucht werden (Woolfrey et al. 2009). Die Rap-Proteine gehören zur Ras-Familie und spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Zelldifferenzierung, -wachstum, -polarität und -adhäsion (Bos 2005). Die Rap-Familie besteht aus fünf Proteinen, Rap1a, Rap1b und Rap2a-c, welche jeweils eine 50%ige Sequenzübereinstimmung mit Ras zeigen (Ryu et al. 2009). Die Rap-vermittelten Signalwege regulieren die synaptische Destabilisierung und Depression, da aktiviertes Rap die Größe der dendritischen Dornen verringert und eine wichtige Rolle bei der Endozytose von AMPA-Rezeptoren spielt (Xie, Haganir & Penzes 2005; Zhu et al. 2002). Ein vollständiger Verlust von Rap1a und Rap1b führt bei konditionalen Rap1-*Knockout*-Mäusen zur Vergrößerung des Cortex und

schwerwiegenden Defekten in der cortikalen Schichtung. Rap1 GTPasen sind also essentiell für die Entwicklung der cortikalen Architektur. Des Weiteren sind Rap1 GTPasen nötig für die Cadherin-vermittelte Adhäsion zu Nicht-neuronalen Zellen. Man kann tatsächlich einen Verlust der Signale von N-Cadherin und Afadin, einem Adaptorprotein und Effektor von Rap1, bei Rap1-*Knockout*-Mäusen feststellen (Carmena, Makarova & Speicher 2011; Knox & Brown 2002; Pan et al. 2008; Shah et al. 2017). Rap1 reguliert weiterhin die Funktion von Integrin (Yi-Lei et al. 2017). Interessanterweise wurde bei Rap1-*Knockout*-Tieren festgestellt, dass während der Gehirnentwicklung am Tag E15 (15 Tage nach Verpaarung) eine dramatische Reduktion der Menge von Gesamt- und aktivem Integrin sowohl in der apikalen als auch in der pialen Region des Cortex vorliegt (Shah et al. 2017). Integrine sind Transmembran-Rezeptoren, die an der Plasmamembran präsentiert werden und an Komponenten der extrazellulären Matrix binden. Sie liegen als Heterodimere vor und bestehen aus α - und β -Untereinheiten (Kerrisk, Greer & Koleske 2013; Rantala et al. 2012); beide Untereinheiten haben eine extrazelluläre N-terminale Domäne und verlaufen jeweils einmal durch die Plasmamembran. Die α - und β -Untereinheiten sind extrazellulär, nicht-kovalent miteinander verbunden und formen gemeinsam eine Bindungstasche für Moleküle der extrazellulären Matrix wie beispielsweise Fibronectin, Kollagen und Laminin (Kinbara et al. 2003). Integrine können durch einen schnellen Wechsel der Konformation oder durch Cluster-Bildung die Zelladhäsion verändern (Arjonen et al. 2012; Chigaev, Sklar & Vorupjensen 2012). Sie regulieren bei der neuronalen Entwicklung Zellmigration, Formation der cortikalen Schicht und Neuritenwachstum (Park & Goda 2016). Viele Integrine sind auch an Synapsen in hohen Mengen vertreten und regulieren die Remodellierung von Synapsen in hippocampalen Neuronen (Liu et al. 2016; Shi & Ethell 2006).

2 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, ein besseres Verständnis für die Bedeutung und Funktionalität des N-terminalen Bereichs des Strukturproteins Shank3 zu erhalten. Die Arbeit basiert auf der Beobachtung, dass die N-terminale SPN-Domäne mit hoher Affinität an kleine G-Proteine der Ras-Familie bindet. Diese Interaktion soll hinsichtlich ihrer zellbiologischen Bedeutung untersucht werden. Hierzu werden die beiden Mutationen Shank3-L68P und Shank3-R12C, die sich in der mit kleinen G-Proteinen interagierenden SPN-Domäne befinden und bei Patienten mit Autismus-Spektrum-Störungen identifiziert wurden, herangezogen. Diese beiden mutierten Shank3-Proteine interagieren nicht mit den kleinen G-Proteinen Ras und Rap. Anhand dieser Mutanten lässt sich im Vergleich zum Wildtyp-Shank3-Protein feststellen, welche Signalwege von der Interaktion zwischen Shank3 und kleinen G-Proteinen beeinflusst werden und welche Auswirkungen diese Interaktion auf die Morphologie und Funktionalität der Nervenzelle hat. Der Ort der Interaktion in Nervenzellen soll mittels Immunzytochemie und konfokaler Mikroskopie aufgeklärt werden. Des Weiteren werden Signalwege, in denen kleine G-Proteine involviert sind, überprüft und die Veränderung der Zusammensetzung der postsynaptischen Dichte im Hinblick auf kleine G-Proteine in Shank3-defizienten Mäusen untersucht. Da Shank3 indirekt auch mit dem Aktinzytoskelett interagiert und die Rap-vermittelte Integrinaktivität die Bildung von Filopodien beeinflusst, wurden auch Veränderungen des Zytoskeletts mit einem Fokus auf Filopodien untersucht.

Das Shank3-Protein wurde in mehreren Synaptopathien wie Autismus-Spektrum-Störungen, Schizophrenie und der Alzheimer'schen Erkrankung als Ursache für fehlfunktionierende Synapsen identifiziert. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen dienen einem besseren Verständnis für die Funktion des Shank3-Proteins.

3 Materialien

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt Deutschland) und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen, wenn es nicht anders angegeben ist.

3.2 Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
BBS (2x)	50 mM BES 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ PO ₄ pH 6,97
Blockierungspuffer für Immunocytochemie	10 % (v/v) Pferdeserum in PBS
DNA-Ladepuffer (6x)	10 mM Tris-HCl, pH 7,6 0,03 % (v/v) Bromphenolblau 0,03 % (w/v) Xylen-Cyanol FF 60 % (v/v) Glycerol 60 mM EDTA
KCM-Puffer (5x)	500 mM KCl 150 mM CaCl ₂ 250 mM MgCl ₂
Lämmli-Probenpuffer (5x)	300 mM Tris/HCl, pH 6,8 50 % (v/v) Glycerin 7,5 % (w/v) SDS 0,5 M DTT 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
PBS (1x)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Permeabilisierungspuffer für Immunocytochemie	0,1 % (v/v) Triton X-100 in 1x PBS

Poly-L-Lysin-Lösung	1 mg/mL Poly-L-Lysin in PBS pH 7,4
RIPA-Puffer	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl; pH 8,0 5 mM EDTA 0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholat 1 % (v/v) NP-40 0,1 % (w/v) SDS
SDS-PAGE-Laufpuffer	1 x Tris/Glycin 0,1 % (w/v) SDS
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, pH 8,0 2 mM EDTA
TBS-T	10 mM Tris/HCl; pH 8,0 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20
Transferpuffer	1 x Tris/Glycin-Puffer 0,02 % SDS 20 % (v/v) Methanol
Tris/Glycin (10x)	0,25 M Tris, pH 8,3 1,92 M Glycin
Versene-Puffer	0,5 mM EDTA 137 mM NaCl 2,68 mM KCl 6,57 mM Na ₂ HPO ₄ 1,32 mM KH ₂ PO ₄
Tyrode's Puffer	10 mM Hepes-NaOH pH 7.5 137 mM NaCl 2,68 mM KCl 0,42 mM NaH ₂ PO ₄ 1,7 mM MgCl ₂ 11,9 mM NaHCO ₃ 5 mM Glucose 0,1% BSA

TSB	1x LB pH 6,1 10 % PEG 3350 5 % DMSO 0,01 M MgSO ₄ 0,01 M MgCl ₂
Lösung A zur Präparation der postsynaptischen Dichte (PSD)	4 mM Hepes, pH 7,4 0,32 M Saccharose 1mM MgCl ₂ 0,5 mM CaCl ₂ 2 µg/mL Pepstatin 10 µg/mL Leupeptin 43,55 µg/mL PMSF
Lösung B zur Präparation der postsynaptischen Dichte (PSD)	4 mM Hepes pH 7,4 0,32 M Saccharose 2 µg/mL Pepstatin 10 µg/mL Leupeptin 43,55 µg/mL PMSF
Lösung C zur Präparation der postsynaptischen Dichte (PSD)	12 mM Tris-HCl pH 8,1 0,32 M Saccharose 1% Triton X 100 2 µg/mL Pepstatin 10 µg/mL Leupeptin 43,55 µg/mL PMSF

3.3 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Autoklav	MediTech Service GmbH, Norderstedt, Deutschland
Bunsenbrenner	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Detektor für Chemilumineszenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Elektrophoreseapparatur für Agarosegele	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektrophoreseapparatur für Polyacrylamidgele	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Inkubator für Bakterien (37°C)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Inkubator für Zellen (37°C/5%CO ₂)	Panasonic Biomedical Sales Europe BV, Etten-Leur, Niederlande
Konfokale Mikroskope	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Laborwaage	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikrovolumen-Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, USA)
Netzgerät für die Stromversorgung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Nukleofektionsgerät	Amaza Biosystems GmbH, Köln, Deutschland
pH-Meter	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
Photometer	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Nümbrecht, Deutschland
Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Sterilarbeitswerkbänke	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexer	Heidolph Instrumentes Labortechnik, Schwabach, Deutschland
Wasserbäder	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH

Zentrifugen	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, USA), Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland), VWR (Hannover, Deutschland)
-------------	--

3.4 Kommerzielle Kits

Kommerzielles Kit	Hersteller
Nukleofektionskit für Rattenneuronen	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
NucleoBond Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland

3.5 Enzyme

Es wurden die FastDigest Restriktionsenzyme der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, USA) verwendet.

3.6 Zellen und Gewebe

Bakterienstämme	Hersteller
<i>E. coli</i> TOP 10 F'	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, USA)

Zelllinien	Firma
HEK 293T (engl. <i>Human embryonic kidney cells with T-Large Antigen</i> , dt. humane embryonale Nierenzellen mit dem T-Large Antigen)	ATCC, Manassas, USA

Primäre Zellen

Rattenneuronen aus Embryonen (E20)	Rattus norvegicus, Wistar-Stamm (Forschungstierhaltung, UKE)
Mausneuronen aus Embryonen (E16)	Shank3 $\alpha\beta^{-/-}$ -defiziente Mäuse (T.Böckers, Ulm)
Adulte Mäuse für Durchflusszytometrie	Shank3 $\alpha\beta^{-/-}$ -defiziente Mäuse (T.Böckers, Ulm)

Gewebe

Maus-Gehirne (P0.5) für Immunhistochemie	Shank3 $\alpha\beta^{-/-}$ -defiziente Mäuse (T.Böckers, Ulm)
--	--

3.7 Medien und Medienzusätze

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium für HEK293T Zellen	DMEM 10 % (v/v) FBS 100 μ g/ml Penicillin/Streptavidin
Einfriermedium für HEK293T Zellen	DMEM 10 % (v/v) FBS 10 % (v/v) DMSO
Hungermedium für HEK293 T Zellen	DMEM 0,1 % (v/v) FBS 100 μ g/ml Penicillin/Streptavidin
Plattiermedium für primäre Neuronen	MEM 0,6 % Glucose 10 % Pferdeserum
Kulturmedium für primäre Neuronen	2% B27 Serum-freier Zusatz 0,5 mM L-Glutamin 0,1 mg/mL Primocin 25 μ M Glutamat (Glutamat wurde nur bei frisch ausgesäten Neuronen verwendet)

3.8 Plasmide

Name des Vektors	Eigenschaften	Quelle
YFP2 Rap1-G12V	pcDNA3-Vektor, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
YFP2 Hras-WT	pcDNA3-Vektor, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
YFP2 Hras-G12V	pcDNA3-Vektor, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
YFP2 Hras-S17N	pcDNA3-Vektor, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
YFP1 Shank3-R12C	pcDNA3-Vektor, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
YFP1 Shank3-L68P	pcDNA3-Vektor, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
YFP1 Shank3-WT	pcDNA3-Vektor, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
PMT2sm HA Leervektor	PMT2sm-Vektor mit HA-Markierung, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
PMT2sm HRas-WT HA	PMT2sm-Vektor mit HA-Markierung, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
PMT2sm HRas-S17N HA	PMT2sm-Vektor mit HA-Markierung, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
PMT2sm HRas-G12V HA	PMT2sm-Vektor mit HA-Markierung, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
pcDNA3.1 myc Shank3-WT	Kodiert Shank3-WT, CMV-Promoter, myc-Sequenz, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp

pcDNA3.1 myc Shank3-L68P	Kodiert Shank3-L68P, CMV-Promoter, myc-Sequenz, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
pcDNA3.1 myc Shank3-R12C	Kodiert Shank3-R12C, CMV-Promoter, myc-Sequenz, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
pSuper	H1-Promotor, f1(+)-Origin, pUC origin, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
pLVTHM	Eukaryotische Expression, EGFP (engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>)-Expression, EF1 α -Promotor, Ampicillin-Resistenz, Vektor für die direkte Klonierung von shRNA oder Sub-Klonierung der H1-shRNA-Kassette aus dem pSuper-Vektor	AG Kreienkamp
pLVTHM-Kontrolle	Basiert auf pLVTHM-Vektor, trägt die shRNA-Information, die gegen Luciferase-mRNA gerichtet ist; H1-Promotor, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
pLVTHM shShank3	Basiert auf pLVTHM-Vektor, trägt die shRNA gegen Shank3, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
pLVTHM shSynGAP	Basiert auf pLVTHM-Vektor, trägt die shRNA gegen SynGAP; Ampicillin-Resistenz	Im Rahmen dieser Arbeit generierter Vektor
psPAX2	Lentiviraler Verpackungsvektor, Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
pMD2.G	Codiert VSV.G; Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp

pHAGE Vektor Shank3-L68P	Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
pHAGE Vektor Shank3-WT	Ampicillin-Resistenz	AG Kreienkamp
pFRET	N-terminale GFP-Sequenz, C-terminale mcherry Sequenz, Kanamycin-Resistenz	AG Kreienkamp
pFRET Shank3-WT N-term.	Unter Nutzung der Sall und EcoRV-Schnittstellen wurde Shank3-WT aus dem pHAGE Shank3-WT-Vektor ausgeschnitten und in den pFRET-Vektor eingebracht, Kanamycin-Resistenz	Im Rahmen dieser Arbeit generierter Vektor
pFRET Shank3-L68P N-term.	Unter Nutzung der Sall und EcoRV-Schnittstellen wurde Shank3-L68P aus dem pHAGE Shank3-L68P-Vektor ausgeschnitten und in den pFRET-Vektor eingebracht, Kanamycin-Resistenz	Im Rahmen dieser Arbeit generierter Vektor
pFRET Shank3-R12C N-term.	Unter Nutzung der Sall und EcoRV-Schnittstellen wurde Shank3-R12C aus dem pHAGE Shank3-R12C-Vektor ausgeschnitten und in den pFRET-Vektor eingebracht, Kanamycin-Resistenz	Im Rahmen dieser Arbeit generierter Vektor

3.9 shRNA-Vektor

Zur Generierung eines SynGAP-Knockdown-Vektors wurden die folgenden Oligonukleotide unter Nutzung der HindIII/BglII-Schnittstellen in den pSuper-Vektor eingefügt (Myung et al. 2005) und anschließend wurde die Sequenz unter Nutzung der EcoRI/ClaI Schnittstellen in den pLVTHM-Vektor eingebracht, um lentivirale Viruspartikel herstellen zu können.

Tabelle 1 SynGAP-RNAi-Oligonukleotide

Name des Oligonukleotids	Sequenz (5' - 3')
SynGAP-RNAi Oligonukleotid Nr. 1	GAT CCC CGA AGC GAT ATT ACT GCG AGT TCA AGA GAC TCG CAG TAA TAT CGC TTC TTT TTG GAA A
SynGAP-RNAi Oligonukleotid Nr.2	AGC TTT TCC AAA AAG AAGCGA TAT TAC TGC GAG TCT CTT GAA CTC GCA GTA ATA TCG CTT CGG G

3.10 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Aldrich bezogen. Die Oligonukleotide, die als Primer bei der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt wurden, wurden mit sterilem und doppelt-destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. Aus dieser Stocklösung wurde eine 10 µM-Lösung hergestellt, die bei der PCR verwendet wurde.

Tabelle 2 Sequenzierungsprimer

Sequenzierungsprimer	Sequenz (5' - 3')
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
RFP rev	GTCACCTTCAGCTTGGCG
GFP1 fwd	AGTTCATGACCGCCGCCGGGA
M13 forward	AGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCA GT
M13 rev	AGCGGATAACAATTTACACAGGAAAC AGCTATG
pcDNA fwd	GGGAGGTCTATATAAGCAGAGC
pcDNA REV	GGCTGGCAACTAGAAGGC
SP6 rev	GATTAGGTGACACTATAG

Tabelle 3 Genotypisierungsprimer

Genotypisierungsprimer	Sequenz (5' - 3')
S12 Primer	CAAGTTCATCGCTGTGAAGG
S10 Primer	CCTCTAGGCCTGCTAGCTGTT
AS3 Primer	AAGAAGCCCCAGAAGTGACA

3.10 Antikörper

Tabelle 4: Primärantikörper

Antikörper	Hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
Erk	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling
MAP2	Kaninchen	1:1000 (IZ)	Antibodies-online
Myc	Maus	1:1000 (IZ)	Sigma
Phospho-Erk (p44/42)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling
Shank3	Meerschweinchen	1:1000 (IZ) 1:1000 (WB)	Tobias Böckers, Ulm
Akt	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling
Phospho-Akt (S473)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling
Tubulin	Maus	1:1000 (WB)	Abcam
HA	Kaninchen	1:1000 (IZ)	Sigma
CD29 9EG7 (aktive Integrine)	Ratte	1:10 (IHC, IZ); 1:100 (FACS)	BD Biosciences, San Jose, USA
MAB1997 (Gesamtintegrine)	Ratte	1:100 (IHC, IZ); 1:100 (FACS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 5: Sekundärantikörper

Antikörper	Hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus-HRP	Ziege	1:5000 (WB)	Immunoreagents, Raleigh, USA
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	1:5000 (WB)	Immunoreagents, Raleigh, USA
Anti-Meerschweinchen-HRP	Ziege	1:5000 (WB)	Immunoreagents, Raleigh, USA
Anti-Kaninchen-	Ziege	1:1000 (IZ);	Thermo Fisher Scientific, Waltham,

Alexa Fluor 488		1:1000 (IHC)	USA
Anti-Maus-Cy3	Ziege	1:1000 (IZ)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-Kaninchen- <i>marinablue</i>	Ziege	1:1000 (IZ)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-Hühnchen- Alexa Fluor 633	Ziege	1:1000 (IZ)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-Ratte-Alexa Fluor 568	Ziege	1:1000 (IHC)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Anzucht und Lagerung von *E.coli*

Für die Anzucht von *E.coli* wurden Vorkulturen mit 3-5 mL LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum mit Bakterien einer einzelnen Kolonie von einer Agarplatte oder aus einem Glycerolstock angeimpft. Die Glycerolstocks wurden hergestellt, indem Bakterien einer über Nacht Kultur mit der gleichen Menge 50% iger Glycerol-Lösung versetzt wurden und in einem Kryoröhrchen bei -80°C für die Langzeitlagerung eingefroren wurden. Für die Kultivierung von *E.coli* in größeren Mengen wurde das LB-Medium mit Flüssigvorkulturen in einer Verdünnung von 1:50 angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 Upm inkubiert.

Tabelle 6 Zusammensetzung des verwendeten LB-Mediums und LB-Agars mit Angabe der eingesetzten Antibiotikakonzentrationen.

LB (Luria Broth) Medium	Trypton 10,0g Hefeextrakt 5,0 g NaCl 5,0 g ad 1000 mL ddH ₂ O pH 7 wurde eingestellt, es wurde autoklaviert und je nach Bedarf Antibiotikum hinzugefügt.
LB (Luria Broth) Agar	Trypton 10,0 g Hefeextrakt 5,0 g NaCl 5,0 g Agar 15,0 g pH 7 wurde eingestellt, Agar wurde autoklaviert. Bei Bedarf wurde der Agar erwärmt, um eine flüssige Konsistenz zu erhalten und es wurde das benötigte Antibiotikum hinzugegeben
Verwendete Antibiotikakonzentrationen	Ampicillin 100 µg/mL Kanamycin 50 µg/mL Tetrazyklin 15 µg/mL

4.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Bakterien für die chemische Transformation

Zur Herstellung chemisch-kompetenter *E.coli*-Bakterien wurde zunächst ein fraktionierter Ausstrich eines bestehenden Glycerolstocks auf eine LB-Platte mit Tetrazyklin durchgeführt. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer Kolonie wurde am darauffolgenden Tag eine 5 mL – LB-Tetrazyklin-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 200 UpM und 37°C inkubiert. Die Vorkultur wurde in einen großen Erlenmeyerkolben mit 500 mL LB-Tetrazyklin überführt und bis zu einer optischen Dichte von OD600 bei 37°C und 200 UpM inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur für 2 min. in Eiswasser abgekühlt und dann bei 3773 g und 4°C für 5 min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 mL eiskaltem TSB resuspendiert. Die Kultur wurde 15 min. auf Eis inkubiert, anschließend aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien wurden bei -80°C gelagert.

4.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

4.1.3.1 Minipräparation

Es wurden 3 mL LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum mit einer einzelnen Kolonie der zur vervielfältigenden *E.coli*-Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 UpM inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 1,5 mL dieser Kultur in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bei 20.000 g 1 min zentrifugiert. Bei den folgenden Schritten wurden Resuspensions-, Lyse- und Neutralisationspuffer der Firma Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) verwendet.

Nach erfolgter Zentrifugation wurde das Pellet in 100 µL Resuspensionspuffer resuspendiert und 100 µL Lysepuffer hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde mehrmals invertiert und 2 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von 100 µL Neutralisationspuffer wurde die Lyse der Zellen beendet. Anschließend wurde für 20 min. bei 20.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert, um die Proteine aus dem Zelllysate zu präzipitieren und von der DNA zu trennen. Der Überstand, der die DNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und es wurden 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde mehrmals invertiert und anschließend für 20 Min bei 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol überschichtet. Es wurde für 5 min. bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand wurde erneut verworfen. Das Pellet wurde 10-15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und das Pellet

wurde in 50 μL ddH₂O resuspendiert. Die isolierte DNA wurde durch einen Restriktionsverdau und eine Sequenzierreaktion überprüft.

4.1.3.2 Midipräparation

Für eine Midipräparation wurden 100 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit 1,5 mL einer Vorkultur angeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Midipräparation wurde entsprechend der Herstellerangaben mit Hilfe des Nucleo Bond Xtra Midi Kits der Firma Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) durchgeführt. Für die Midipräparation von DNA, die zur Transfektion von Neuronen eingesetzt werden sollte, wurde das Nucleo Bond Xtra Midi EF Kit verwendet, da endotoxinfreie DNA eine bessere Transfektionseffizienz gewährleistet. Nach erfolgter Midipräparation wurde die DNA mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Die DNA-Konzentration wurde mittels Epoch™ Multi-Volume Spectrophotometer System bestimmt und überprüft, ob das Verhältnis der Absorption von 260 nm zu 280 nm (A_{260}/A_{280}) zwischen 1,8 und 2,0 liegt, um sicher zu gehen, dass es sich um hochreine DNA handelt. Die DNA-Konzentration wurde auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ eingestellt.

4.1.4 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA wurde eingesetzt, um DNA nach einer erfolgten Midipräparation zu überprüfen oder um ein neues Konstrukt aus zwei verschiedenen DNA-Fragmenten zu erzeugen. Hierzu wurden Restriktionsenzyme verwendet, die eine spezifische Basensequenz von 6-8 Basenpaaren erkennen und präzise dort die DNA schneiden. Je nachdem welches *FastDigest*-Enzym der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) verwendet wurde, entstehen durch diesen Restriktionsverdau einzelsträngige DNA-Überhänge oder keine Überhänge. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für einen Restriktionsverdau ist in der folgenden Tabelle gezeigt.

Tabelle 7 Restriktionsansatz

Komponente	20 μL Restriktionsansatz
DNA	1 μg
10 x <i>FastDigest</i> Puffer	2 μL
<i>FastDigest</i> Restriktionsenzym	je 1 μL
Nuklease-freies Wasser	ad 20 μL Nuklease-freies Wasser

4.1.5 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um die Freisetzung von 5'- und 3'-Phosphatgruppen aus DNA zu katalysieren wurde die thermosensitive Alkaline Phosphatase FastAP (Thermo Scientific, Waltham, USA) verwendet, um eine Religation des Ausgangsvektor bei der Klonierung zu verhindern. Hierzu wurde 1 μ L FastAP dem Restriktionsansatz (siehe Tabelle 7) hinzugefügt. Der Restriktionsansatz wurde vermischt, kurz herunterzentrifugiert und anschließend 10 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 15 Min. bei 65°C erhitzt, um die Phosphatase zu inaktivieren.

4.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Methode der Agarose-Gelelektrophorese wurde dazu verwendet, DNA-Fragmente nach ihrer Größe zu trennen. Hierfür wurden 0,8 – 1,3 %ige Agarosegele hergestellt, indem Agarose in TAE-Puffer erhitzt wurde bis die Lösung klar war und keine kleinen Partikel mehr sichtbar waren. Es wurden 6 μ L *Midori green DNA Stain* (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland) pro 100 mL Agarose-TAE-Lösung hinzugegeben und ein Gel gegossen. Sobald das Gel fest geworden war, wurden die Proben und zum Größenvergleich auch ein 1kb-DNA-Marker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgetragen. Wenn es sich um Proben aus einem Restriktionsverdau oder von einer Genotypisierungs-PCR handelte, musste kein Ladepuffer hinzugegeben werden, da die verwendeten Puffer auch die Komponenten eines Ladepuffers für die Gelelektrophorese enthielten. Bei anderen DNA-Proben wurde ein 6xLadepuffer in einem Verdünnungsverhältnis von 1:6 hinzugegeben. Die DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese bei 100 V nach der Größe aufgetrennt und mittels UV-Licht detektiert.

4.1.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Gelextraktion wurde durchgeführt, um DNA-Fragmente einer bestimmten Größe aus einem Agarose-Gel extrahieren und aufreinigen zu können. Die erhaltene DNA wurde für weitere Klonierungsschnitte genutzt. Für die Gelextraktion wurde das GeneJet Gel Extraction Kit von der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, USA) verwendet und das Protokoll nach Herstellerangaben ausgeführt.

4.1.8 Ligation

Bei der Ligation katalysiert das Enzym Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylende von zwei doppelsträngigen DNA-

Fragmenten. Die Ligase verbindet sowohl glatte als auch kohäsive Enden, die zueinander komplementär sind. Der Ligationsansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht inkubiert. Es wurde stets ein molares Verhältnis von 1:3 Vektor zu Insert DNA verwendet.

Tabelle 8 Ligationsansatz

Komponente	20 µl Reaktionsansatz
T4 DNA Ligase Buffer (10x)	2 µl
Vector DNA	0.020 pmol
Insert DNA	0.060 pmol
Nuklease-freies Wasser	ad 20 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

4.1.9 Transformation zur Vervielfältigung von rekombinanter DNA

Zur Vervielfältigung rekombinanter DNA wurden die chemisch kompetenten *E.coli*-Bakterien des Top10F'-Stammes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Es wurden 1 µg DNA oder 10 µL Ligationsansatz eingesetzt und in KCM-Puffer verdünnt. Die *E.coli*-Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit dem DNA-Ansatz vermischt und für 20 min. auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden für 45 Sek. bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend 2 min. auf Eis inkubiert. Es wurde 1 mL LB-Medium hinzugegeben und 1 h bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 1 min. bei 20.000 g zentrifugiert, das Pellet wurde in 100 µL LB-Medium resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die LB-Agarplatte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und am darauffolgenden Tag konnten einzelne Kolonien ausgewählt werden, um hiermit Vorkulturen anzupflanzen.

4.1.10 Sequenzanalyse von Plasmid-DNA

Zur Bestimmung der Nukleotidabfolge eines bestimmten DNA-Abschnitts wurde eine Sequenzierung der Plasmid-DNA durchgeführt. Hierfür wurde eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Bei dieser Polymerasekettenreaktion wird ausgehend von einer bekannten Sequenz einer der beiden komplementären Stränge verlängert. Hierfür wurde ein Sequenzspezifischer Primer designt. Nach der PCR wurde die DNA gefällt und anschließend mittels Sanger-Methode von der diagnostischen Abteilung des Instituts für Humangenetik sequenziert. Da die Sequenzierung häufig zur Überprüfung von Plasmid-DNA nach einer

Klonierung oder einer neuen Midipräparation durchgeführt wurde, wurde die erhaltene DNA-Sequenz anschließend mit der gewünschten DNA-Sequenz verglichen.

4.1.11 Polymerase-Ketten-Reaktion zur Genotypisierung von Shank3-Knockout-Mäusen

Für die Genotypisierung von Mäusen der Shank3 $\alpha\beta^{-/-}$ -defizienten Mauslinie (T-Böckers, Ulm) wurde eine Biopsie der Schwanzspitze genommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 50 μL DirectPCR Tail (VWR Life Science Competence Center, Erlangen, Deutschland) und 1 μL Proteinase K (10 mg/mL) hinzugegeben. Anschließend wurde die Probe zur Lyse bei 55°C über Nacht in einem Thermomixer geschüttelt und am nächsten Tag die Aktivität der Proteinase durch Erhitzen für 45 Min bei 85°C deaktiviert. Die Probe wurde 1 Min. zentrifugiert und 2 μL des Überstandes wurden für die PCR eingesetzt. Für jede Probe wurde mittels spezifischer Primer getestet, ob die Maus ein Wildtyp und/oder defizientes Gen besitzt. So kann zwischen Shank3-Wildtyp-, Shank3-defizienten (*Knockout*) und heterozygoten Tieren unterschieden werden. In Tabelle 9 ist die Zusammensetzung der benötigten PCR-Reaktionsansätze angegeben.

Tabelle 9 PCR-Ansatz zur Genotypisierung von Mäusen einer Shank3-defizienten Mauslinie

Zur Detektion des *SHANK3*-Wildtyp- und *SHANK3*-defizienten Allels mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese wurden zwei PCR-Reaktionsansätze mit entsprechenden spezifischen Primern angesetzt.

	Reaktionsansatz Wildtyp	Reaktionsansatz <i>Knockout</i>
10x Puffer/ 15mM MgCl ₂ (Red)	3 μL	3 μL
MgCl ₂ 25mM	0,6 μL	0,6 μL
dNTPs (10 mM)	1,5 μL	1,5 μL
Primer 1 S12	2 μL	-
Primer 2 S10	-	2 μL
Primer 3 AS3	2 μL	2 μL
Q-Solution 5x	4 μL	4 μL
Maus-DNA	2 μL	2 μL
Taq-Polymerase	0,3 μL	0,3 μL
ddH ₂ O	14,6 μL	14,6 μL

Die Tabelle 10 zeigt die einzelnen Schritte des verwendeten PCR-Programms.

Tabelle 10 PCR-Programm zur Genotypisierung von Shank3-Knockout-Mäusen.

Es wurden eine Initiation und 30 Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation durchgeführt.

Schritt der PCR	Dauer	Temperatur
Initiation	1 Min	94°C
Denaturierung	45 Sek	94 °C
Annealing	45 Sek	58°C
Elongation	45 Sek.	72 °C

Nach der erfolgten PCR wurden die Proben auf ein 1,3% iges Agarosegel mit Zusatz des DNA-interkalierenden Farbstoffes Midori Green (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, Deutschland) aufgetragen und die Banden mittels UV-Strahlung detektiert. In Abbildung 5 ist das Ergebnis einer Genotypisierung einer Shank3-WT, Shank3-heterozygoter und Shank3-defizienter Maus dargestellt.

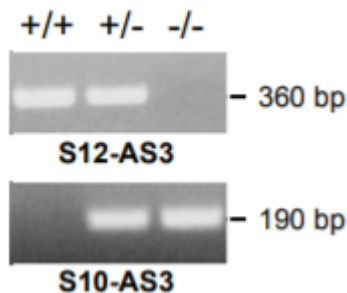


Abbildung 5 Ergebnis einer Genotypisierungs-PCR von Shank3 WT (+/+), Shank3-heterozygoter (+/-) und Shank3-defizienter (-/-) Maus.
(Schmeisser et al. 2012)

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Sowohl HEK293T- als auch Cortexneuronen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Für die Herstellung von HEK293T-Lysaten wurde kalter RIPA-Puffer mit Zugabe von den Proteaseinhibitoren Pepstatin (2 µg/mL), PMSF (43,55 µg/mL) und Leupeptin (10 µg/mL) eingesetzt, während für die Neuronen RIPA-Puffer mit einer EDTA-freien Complete-Inhibitor-Cocktail-Tablette (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet wurde. Bei den Experimenten, bei denen die Phosphorylierung von Proteinen mittels spezifischer Antikörper untersucht wurde, wurden zu dem RIPA-Puffer zusätzlich Phosphatase-Inhibitoren (PhosStop-Tablette, Merck; Darmstadt, Deutschland) zugesetzt. Für

die Lyse von Zellen einer 10 cm-Kulturschale wurde 1 mL RIPA-Puffer und für eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 12 Vertiefungen wurden 200 μ L RIPA-Puffer mit den entsprechenden Zusätzen eingesetzt. Die Zellen wurden mit dem entsprechenden Lyse-Puffer 15 Min. auf Eis und unter leichtem Schwenken inkubiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei 4°C und 20.000 g 20 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und es wurde Lämmli-Puffer zugesetzt, um die Proben in einem Immunblot zu untersuchen.

4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die zu analysierenden Zelllysate wurden zunächst mit Lämmli-Probenpuffer versetzt und für 5 Min. bei 95°C erhitzt. Die einzelnen Proteine aus den Proben wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Größe aufgetrennt. Hierzu wurde ein 1,5 mm-dickes Polyacrylamid-Gel mit dem BioRad Protein II-System (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und der in Tabelle 11 aufgeführten Zusammensetzung gegossen. Hierbei wurde abhängig von den aufzutrennenden Proteinen ein 6%, 8%, 10% oder 12%iges Trenngel gegossen. Um die Größe der detektierten Proteine bestimmen zu könne, wurde ein PageRuler Plus Pre-Stained Protein Ladder Proteinmarker (10 bis 250 kDa) von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) verwendet. Es wurden 8 μ L Proteinmarker und 15-30 μ L Probe aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-PAGE-Laufpuffer bei Raumtemperatur zunächst für 5 Min. bei 100 V und dann bei 150 V bis der Bromphenolblau-Farbstoff am unteren Rand des Gels angekommen war.

Tabelle 11 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.

Die verwendeten Chemikalien wurden von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

	12%iges Trenngel	10%iges Trenngel	6%iges Trenngel	Sammelgel
ddH ₂ O	3,2 mL	3,9 mL	4,9 mL	2,8 mL
30% Acrylamid	4,0 mL	3,3mL	2,3 mL	0,7 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,0 mL	0,0 mL	0,0 mL	0,5 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,6 mL	2,6 mL	2,6 mL	0,0 mL
10% SDS	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,04 mL
TEMED	0,007 mL	0,007 mL	0,007 mL	0,003 mL
APS	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,04 mL

4.2.3 Immunblot

Bei dem Immunblot werden die Proteine, die zuvor mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt wurden, auf eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) übertragen und anschließend durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Hierzu wurde eine Nassblotapparatur (Biorad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und der entsprechende Transferpuffer verwendet, um die Proteine bei 400 mA zu übertragen. Nach 100 Min. wurde der Transfer gestoppt und die Membran wurde anschließend 1 Std. unter Schwenken und bei Raumtemperatur in 5% Milchpulver/TBS-T inkubiert. Der Primärantikörper wurde entsprechend der Herstellerangaben in 5% Milchpulver/TBS-T angesetzt und die Membran wurde 2 Std. bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Membran wurde drei Mal für 10 Min mit TBS-T-Puffer gewaschen und dann 45-60 Min bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper, der in TBS-T verdünnt wurde, inkubiert. Es wurde erneut drei Mal mit TBST gewaschen und die Membran wurde zur Detektion 5 Min. in ECL-Substrat (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) inkubiert. Das chemilumineszente Signal wurde mittels ChemiDoc XRS (Biorad Laboratories GmbH, München, Deutschland) detektiert und mit der Image Lab Software (Biorad Laboratories GmbH, München, Deutschland) quantitativ ausgewertet.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen

Bei den HEK293T-Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen (engl. *human embryonic kidney cells*; Graham 1977), welche zusätzlich das SV40 large T-Antigen exprimieren und so die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem SV40 origin of replication ermöglicht. Diese Eigenschaft der HEK293T-Zellen wird bei der Produktion lentiviraler Partikel benötigt.

4.3.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um weitere Zellen für die Langzeitlagerung bei -150°C herzustellen, wurden jeweils 1×10^6 Zellen pro Kryoröhrchen in Einfriermedium (DMEM, 10% FBS, 10% DMSO) resuspendiert. Es wurden jeweils 1 mL Zellen in jedes Kryoröhrchen pipettiert und mit einer Einfrierhilfe über Nacht bei -80°C heruntergekühlt. Am darauffolgenden Tag wurden die Kryoröhrchen für die Langzeitlagerung bei -150°C eingefroren. Um Zellen aus der Langzeitlagerung in Kultur

zu nehmen wurden sie bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in ein 50 mL-Reaktionsgefäß überführt und tropfenweise und unter Schwenken mit 10 mL Kulturmedium versetzt. Anschließend wurden die Zellen 5 Min. bei 1000 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 mL Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden auf eine 10 cm-Kulturschale ausplattiert und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.3.3 Passagieren von Zellen

Die HEK293T-Zellen wurden stets nach drei bis maximal vier Tagen passagiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 4-5 mL Versene gewaschen, für 3-5 Min mit 1 mL 1xTrypsin/Versene inkubiert und die abgelösten Zellen wurden in 9 mL Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in der gewünschten Zelldichte auf weitere Kulturschalen oder beschichtete Mikrotiterplatten ausgesät.

4.3.4 Präparation der postsynaptischen Dichte aus dem Gehirn adulter Mäuse

Zur Isolierung der postsynaptischen Dichte wurde die adulte Maus zunächst mit Kohlenstoffdioxid betäubt und anschließend dekapitiert. Die Schädeldecke wurde mit einer Schere geöffnet. Anschließend wurde das Gehirn nach Zugabe von 5 mL Lösung A hypotonisch lysiert und mit Hilfe eines Potters mechanisch homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein 15 mL-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis kontinuierlich gekühlt. Anschließend wurde das Homogenisat für 10 Min. bei 1400 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 mL Lösung A resuspendiert und erneut bei 1400 g und 4°C 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand der zweiten Zentrifugation wurde in ein neues 15 mL-Reaktionsgefäß gegeben. Es wurde 10 Min. bei 710 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde in Corex-Röhrchen überführt. Es wurden 100 µL des Überstandes mit 25 µL 5xLämmli-Puffer versetzt und als P1-Probe (postnukleäre Fraktion) aufbewahrt. Der restliche Überstand wurde nach sorgfältigem Austarieren zur Sedimentation der Synpatosomen und Mitochondrien bei 13800 g und 4°C 15 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 mL Lösung B resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 100 µL P2-Probe zur Qualitätskontrolle der Aufreinigung abgenommen und mit 25 µL 5x Lämmli-Puffer versetzt. Die restliche Suspension wurde auf einen Saccharose-Gradienten aufgetragen. Hierzu wurden 1,2 molare, 1,0 molare und 0,85 molare Saccharose-Lösung mit Hilfe einer Peristaltikpumpe langsam und in der genannten Reihenfolge in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überschichtet. Es wurden jeweils 3 mL der verschiedenen Saccharose-Lösungen eingesetzt. Anschließend wurden 3,8 mL der Protein-Lösung auf den Saccharose-Gradienten aufgetragen. Die

Ultrazentrifugationsröhrchen wurden 2 Std. bei 82500 g und 4°C zentrifugiert. Die weiße Fraktion der Synaptosomen lag zwischen der 1-molaren und 1,2-molaren Saccharose-Schicht und wurde mittels einer Einweg-Pasteurpipette vorsichtig isoliert. Die Lösung wurde auf ein Volumen von 15 mL mit der Lösung B aufgefüllt und es wurden 15 mL Lösung C hinzugegeben. Die Lösung wurde 15 Minuten bei 4°C rotiert und anschließend 20 Min. bei 32800 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet enthielt die PSD-Proteine; es wurde in 300 µL Lösung B resuspendiert und in 50 µL Aliquots bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

4.3.5 Immunhistochemische Analyse von Mäusen

Einen halben Tag alte Mäuse (P0,5) wurden dekapitiert und die Gehirne entnommen. Die Gehirne wurden zwei Mal in PBS gewaschen und für 2 Tage in 4% PFA/PBS in einem 2 mL-Reaktionsgefäß bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Gehirne mit PBS drei Mal gewaschen und dann in 4,5 %iger Agarose eingebettet. Das Gewebe wurde hierzu mit Whatman-Papier trocken getupft und anschließend in einem kleinen Wägeschälchen mit 4,5% iger Agarose-Lösung luftblasenfrei ausgegossen. Nach 30 Minuten wurde das in Agar-eingebettete Gehirn zu einem kleinen Block zurecht geschnitten. Es wurde eine frische Rasierklinge in das Vibratom eingespannt und das Becken wurde mit PBS gefüllt. Das eingebettete Gehirn wurde mit Gewebekleber (Histoacryl) auf dem Probenhalter fixiert und nach dem Aushärten des Klebers in das PBS-gefüllte Becken eingesetzt. Es wurden 50 µm-Coronalanschnitte angefertigt. Die einzelnen Schnitte wurden in die mit jeweils 1 mL-PBS-gefüllten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit insgesamt 24 Vertiefungen überführt und anschließend gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte zunächst mit 0,5 mL Blockierungs- & Permeabilisierungslösung (PBS, 10 % Pferdeserum, 0,5 % Triton X-100) versetzt und 1 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (verdünnt in PBS mit 10 % Pferdeserum) unter leichtem Schwenken inkubiert. Der Antikörper CD29 9EG7 erkennt spezifisch aktive Integrine, während der MAB1997-Antikörper die Gesamtintegrine erkennt. Zusätzlich wurde auch der Map2-Antikörper als dendritischer Marker eingesetzt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit den sekundären Antikörpern (in PBS verdünnt) versetzt. Es wurden Alexa Fluor 568 (Ratte) für die Erkennung von Integrinen und Alexa Fluor 488 (Kaninchen) für die Erkennung von Map2 eingesetzt. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte über Nacht unter leichtem Schwenken bei 4°C. Anschließend wurden die Schnitte 30 Min. bei RT auf dem Schüttler mit DAPI-Lösung (1 mg/mL-DAPI-Stocklösung wurde 1:5000 in PBS verdünnt) inkubiert. Die Schnitte wurden in PBS für 15

Min. auf dem Schüttler gewaschen und anschließend mit Mowiol auf Objektträger mit Deckgläschen eingebettet. Die Objektträger wurden im Dunklen getrocknet und anschließend mittels konfokaler Mikroskopie analysiert.

4.3.6 Beschichtung von Mikrotiterplatten und Deckgläschen

4.3.6.1 Beschichtung mit Poly-L-Lysin

Für die Kultivierung der hippocampalen und corticalen Neuronen wurden Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen (18 mm, Karl Hecht GmbH & Co KG, Sonderheim/Rhön, Deutschland) und Mikrotiterplatten mit 12 Vertiefungen verwendet. Die Deckgläschen wurden verwendet, um die hippocampalen Neuronen mittels immunzytochemischer Färbung und Mikroskopie zu analysieren, während die Mikrotiterplatten beschichtet wurden, um die corticalen Neuronen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und Immunblot zu untersuchen. Die verwendeten Deckgläschen wurden hierzu 4 Stunden bei 200°C sterilisiert und einzeln in jeweils eine der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte überführt. Die Deckgläschen oder auch die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden mit 1 mL einer 1 mg/mL Poly-L-Lysin-Lösung in PBS überschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Platten wurden sieben Mal mit ddH₂O gewaschen und bei 4°C gelagert.

4.3.6.2 Beschichtung mit Ornithin und Laminin

Für die Analyse der Integrinaktivität wurden die Deckgläser mit Ornithin und Laminin beschichtet. Hierzu wurden sie in Mikrotiterplatten überführt und zunächst mit 1 mL Poly-L-Ornithin (Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland, 0,01%) pro Vertiefung überschichtet. Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend ein Mal mit 1x PBS-Puffer gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit 1 mL Laminin (Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland, 4 µg/mL) in PBS überschichtet, über Nacht im Inkubator bei 5 %CO₂ und 37°C inkubiert und am darauffolgenden Tag drei Mal mit PBS gewaschen. Die Platten wurden bis zur Aussaat der Neuronen bei 4°C gelagert.

4.3.7 Präparation von hippocampalen und corticalen Neuronen aus Ratten- und Mausembryonen

Die tragende Ratte oder Maus wurde mit Kohlenstoffdioxid betäubt und anschließend dekapitiert. Die Ratten wurden 20 Tage nach der Verpaarung (E20) und die Mäuse 16 Tage nach der Verpaarung (E16) analysiert. Nach der Dekapitierung wurde die Bauchdecke geöffnet und der Uterus mit den Embryonen herausgenommen. Die Embryonen wurden aus den Fruchtblasen isoliert und dekapitiert. Die Gehirne der Embryonen wurden entnommen

und in eine Petrischale mit 7 mL Hank's buffered salt solution (HBSS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit 100 µg/mL Penicillin/Straptavidin überführt. Unter Verwendung eines Binokulars wurden die Hemisphären isoliert, die Hirnhaut entfernt und die Hippocampi in eine separate Kulturschale mit HBSS und Antibiotikum überführt. Die Hemisphären ohne Hippocampus wurden separat als Cortex in einer anderen Kulturschale gesammelt. Die Hippocampi wurden in ein 15 mL-Reaktionsgefäß überführt, mit insgesamt 4,5 mL HBSS-Puffer mit Penizillin/Streptavidin (Pen/Strep) versetzt und es wurden 0,5 ml 10fach-konzentriertes Trypsin hinzugegeben. Die Cortices wurden hingegen mechanisch zerkleinert, in ein 50 mL-Reaktionsgefäß überführt und es wurden 45 mL HBSS mit Pen/Strep und 5 mL Trypsin hinzugegeben. Die Hippocampi wurden 15 Min und die Cortices 20 Min. bei 37°C im Wasserbad geschwenkt. Anschließend wurden die Neuronen jeweils insgesamt fünf Mal mit MEM-Medium mit Zusatz von 0,6 % (w/v) Glucose und 10% (v/v) Pferdeserum gewaschen. Zur Vereinzelung der Neuronen wurden die Neuronen trituriert. Hierzu wurden sterile Glaspipetten über der Flamme eines Bunsenbrenners auf drei verschiedene Größen eingestellt und die Neuronen wurden ungefähr 10 Mal mit jeder Glas-Pasteurpipette durch Hoch- und Herunterpipettieren vereinzelt. Die Cortex-Neuronen wurden zusätzlich mit einem Zellsieb (0,45 µm Porengröße) filtriert. Die Zellzahl von Hippocampus- und Cortex-Neuronen wurden jeweils mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und es wurden 350.000 Hippocampus-Neuronen pro Deckgläschen und 500.000 Cortex-Neuronen pro Deckgläschen in Mikrotiterplatten ausgesät. Hierfür wurden die zuvor mit Poly-L-Lysin- oder Ornithin/Laminin-beschichteten Platten verwendet. Die Neuronen wurden 3-4 Stunden bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert und anschließend wurde das Plattiermedium gegen das Neuronen-Kulturmedium ausgetauscht. Die weitere Kultivierung der Neuronen erfolgte ebenfalls bei 5% CO₂ und 37°C.

4.3.8 Virusproduktion

Einen Tag vor der Transfektion wurden HEK293T-Zellen auf 10cm- Platten ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 60% aufwiesen. Am darauffolgenden Tag wurden die HEK293T-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Hierzu wurde 15 µg pLVTHM shShank3 oder Kontroll-Plasmid mit 5 µg psPAX.2 und 2,5 µg pMD2.G zusammenpipettiert und auf ein Volumen von 900 µL mit ddH₂O aufgefüllt. Es wurde 100 µL Calciumchlorid (2,5 M) unter Vortexen hinzugegeben und unmittelbar danach 1000 µL 2xBBS-Puffer ebenfalls unter Vortexen tropfenweise hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 15 Min. bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise und gleichmäßig auf das

Medium der ausgesäten HEK293T-Zellen gegeben. Es wurde unter S2-Sicherheitsbedingungen gearbeitet. Nach 6 Std. wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und 5 mL frisches Medium für die 10 cm-Kulturschale eingesetzt. Nach 48 und 72 Std. wurde der Virusüberstand geerntet. Hierzu wurde der Virusüberstand mit einem 0,45 µM-Filter filtriert und 3 Volumeneinheiten Filtrat wurden anschließend mit einer Volumeneinheit *Lenti-X Concentrator* (Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France) versetzt. Dieser Mix wurde mindestens 30 Min. bis ü.N. bei 4°C inkubiert und dann wurden die enthaltenen Viruspartikel bei 1500 g und 4°C für 45 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 100 µL PBS resuspendiert. Das Virus wurde unmittelbar nach dem Resuspendieren aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.3.9 Transfektion von primären Neuronen

Zur Transfektion von primären hippocampalen Neuronen, die in einer Mikrotiterplatte mit 12 Vertiefungen auf PLL-beschichteten Deckgläschen ausgesät worden waren, wurde die Calcium-Phosphat-Methode angewendet. Die Neuronen wurden 7 Tage nach der Aussaat transfiziert. Zunächst wurde in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß 5 µg DNA vorgelegt. Es wurde 5 µL 2,5M-CaCl₂ hinzugegeben und das Volumen auf 50 µL mit sterilem ddH₂O aufgefüllt. Unter Vortexen wurde 50 µL 2xBBS-Puffer hinzugegeben und anschließend wurde der Ansatz 15 Min. bei RT inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde dann auf die Zellen pipettiert und die Zellen wurden 2 Std. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden sieben Mal mit HBSS-Puffer gewaschen und es wurde 1 mL frisches Neuronen-Kulturmedium pro Vertiefung eingesetzt.

4.3.10 Nukleofektion von primären Neuronen

Für die Nukleofektion wurde zunächst jeweils 300 µL Neurobasal mit allen Zusätzen auf zuvor mit Ornithin und Laminin beschichtete Deckgläschen gelegt. Die Platten wurden anschließend im Inkubator vortemperiert. Des Weiteren wurden pro Nukleofektions-Ansatz 500 µL MEM-Medium mit 0,6% Glucose und 10% Pferdeserum in einem 50 mL-Reaktionsgefäß ebenfalls im Inkubator vortemperiert. Für die Nukleofektion wurde das Nucleofector Kit der Firma Lonza (Basel, Schweiz) verwendet. Die so genannte Ergänzungslösung (engl. *Supplement Solution*) wurde mit der Nukleofektionslösung (engl. *Nucleofector Solution*) vermischt. Pro Reaktionsansatz wurden 5x10⁶ Zellen verwendet. Die Zellen wurden 5 Min. bei 80 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden vorsichtig in 100 µL Nucleofektionslösung mit Zusätzen

resuspendiert. Als nächstes wurden 3 µg der gewünschten Plasmid-DNA mit 100 µL der Zellsuspension vermischt und in die dem Kit beiliegende Küvette luftblasen-frei überführt. Es wurde das Programm 0.003 des Amaxa-Nukleofektors verwendet, um die Nukleofektion durchzuführen. Es wurden 500 µL von dem MEM-Medium mit Zusätzen zu den Zellen zugefügt und die Zellsuspension wurde anschließend vorsichtig in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte mit dem zuvor vorgelegten Medium pipettiert. Das Medium wurde nach 4 Stunden vollständig gegen Neuronenkulturmedium ausgetauscht. Es wurden 750 µL Medium pro Vertiefung eingesetzt.

4.3.11 Transduktion von primären Neuronen

Zur Transduktion von primären Neuronen wurde 5 µL Virussuspension pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit Neuronen sieben Tage nach der Aussaat eingesetzt. Die Virussuspension wurde direkt in das Kulturmedium gegeben und die Platte wurde anschließend leicht geschwenkt. Es wurde entsprechend der S2-Sicherheitsbestimmungen gearbeitet und die Zellen wurden anschließend in einem für die Sicherheitsstufe 2 zugelassenem Inkubator bei 5% CO₂ und 37 °C kultiviert. Mittels Virus-Infektion wird hierbei die genetische Information für die Produktion eines bestimmten Proteins auf die neuronalen Zellen übertragen. Die infizierten Neuronen exprimieren nach erfolgreicher Transduktion das gewünschte Protein.

4.3.12 Immunzytochemie

Die Neuronen wurden 14-16 Tage nach der Aussaat bzw. 7 Tage nach der Transfektion oder Transduktion ein Mal mit PBS gewaschen und anschließend 15 Min. mit 4% PFA in PBS zur Fixierung der Zellen bei Raumtemperatur inkubiert. Die HEK293T-Zellen wurden zwei Tage nach der Aussaat mit 4% PFA in PBS ebenfalls für 15 Minuten fixiert und es wurde das gleiche Protokoll zur immunzytochemischen Färbung verwendet. Die Zellen wurden nach der Fixierung drei Mal mit 1x PBS gewaschen und drei Minuten mit dem Permeabilisierungspuffer (0,1 % Triton X-100 in PBS) inkubiert. Die Zellen wurden erneut drei Mal mit PBS gewaschen und mit 10% Pferdeserum in PBS eine Std. bei Raumtemperatur zur Blockierung unspezifischer Bindestellen inkubiert. Die primären Antikörper wurden in 2% Pferdeserum in PBS verdünnt. Das Deckgläschen mit den Zellen wurde über Nacht bei 4°C oder 2 Stunden bei Raumtemperatur mit der Antikörper-Lösung inkubiert. Die Zellen wurden drei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper, der in PBS verdünnt wurde, für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden drei Mal mit PBS und anschließend kurz mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen.

Die Deckgläser wurden mit *ProLong Diamond Antifade Mountant* mit oder ohne DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) auf den Objektträgern (Karl Hecht GmbH & Co KG, Sonderheim/Rhön, Deutschland) eingebettet.

4.3.13 Mikroskopie

Es wurden die konfokalen Mikroskope SP5 und SP8 der Firma Leica verwendet.

4.3.14 Quantitative Analyse und Statistik

Die quantitative Auswertung der durch konfokale Mikroskopie erhaltenen Bilder wurde mit dem ImageJ Fiji-Programm durchgeführt. Für die quantitative Auswertung der Immunblot-Daten wurde die Image Lab Software von Bio-Rad (München, Deutschland) verwendet. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit der BD FACSDIVA™ Software von BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Graph Pad Prism Programm (La Jolla, USA) ermittelt.

4.3.15 Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) mittels Mikroskopie

Die HEK293T-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten mit 12 Vertiefungen und PLL-beschichteten Deckgläschen ausgesät, und einen Tag nach der Aussaat mittels Turbofect mit den pFRET- und HRas-Konstrukten ko-transfiziert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 4%PFA/PBS fixiert und mit Mounting Medium eingedeckelt. Für die Lebendzellmikroskopie wurde das Deckgläschen allerdings in eine entsprechende Lebendzellmikroskopie-Kammer gelegt und mit 500 µL Kulturmedium überschichtet. Zur mikroskopischen Analyse des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers wurde das konfokale Mikroskop Leica SP5 verwendet und gleichzeitig die Emission von GFP (509 nm) und mCherry (610 nm) aufgenommen, während eine GFP-spezifische Anregung bei 488 nm erfolgte. Um die FRET-Effizienz zu bestimmen wurde für die Daten-Prozessierung die Imaris-Software eingesetzt. Der FRET-Koeffizient wurde zur übersichtlichen farblichen Visualisierung in den Werten 0 bis 255 umgerechnet; hierbei entspricht der Wert 0 einem tiefen Blau-Ton, während die rote Farbe eine besonders hohe FRET-Effizienz darstellt.

4.3.15 Durchflusszytometrie

4.3.15.1 Durchflusszytometrische Analyse von HEK293T-Zellen

Die HEK293T-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf Mikrotiterplatten mit 12 Vertiefungen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit Turbofect transfiziert.

Hierbei wurden 1 µg Gesamt-DNA mit 100 µL serumfreiem DMEM-Medium und 2 µL Turbofect vermischt und 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Der DNA-Turbofect-Mix wurde auf die Zellen getropft. Bei den Versuchen mit EGF-Stimulation wurde 4 h nach der Transfektion das Medium gegen Hungermedium (DMEM, 0,1% FBS) ausgetauscht. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen ggf. für 20 min. im Inkubator mit EGF stimuliert und anschließend mit 100 µL Trypsin abgelöst und resuspendiert. Es wurden 500 µL DMEM/0,1% FBS hinzugegeben und die Zellsuspension wurde in ein Röhrchen für die Durchflusszytometrie überführt. Die Fluoreszenz, sowie Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wurden mittels Durchflusszytometer FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, USA) analysiert. Für die durchflusszytometrischen FRET-Messungen wurde hingegen FACS AriaIIIu (BD Biosciences, San Jose, USA) eingesetzt. Bei der FRET-Messung wurde GFP mit einer Wellenlänge von 488nm angeregt und das mCherry-Signal im PE-TexasRed-Kanal bei 610/620nm detektiert.

4.3.15.2 Durchflusszytometrische Messung von Neuronen

Die adulten Mäuse wurden mit CO₂-Begasung betäubt und getötet. Anschließend wurde eine Perfusion durchgeführt mit HBSS-Puffer. Das Gehirn wurde isoliert und der Hippocampus in ein Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 1 mL StemPro Accutase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) pro Hippocampus eingesetzt und 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Hippocampus trituriert und durch ein Zell-Sieb (70 µm) filtriert. Die Zellen wurden mit Tyrode's Puffer gewaschen, in 25% Percoll/HBSS resuspendiert und mit 2 mL HBSS-Puffer überschichtet (siehe hierzu Juan et al. 2012; Guez-Barber et al. 2012). Anschließend wurde bei 400 g und 22°C 25 min. zentrifugiert. Die weiße Schicht und das HBSS wurden verworfen und das Pellet wurde zwei Mal mit Tyrode's Puffer gewaschen. Die Zellen wurden 10 min. mit 4%iger PFA/PBS-Lösung fixiert und erneut zwei Mal mit Tyrode's Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (aktive Integrine: 9EG7; Gesamtintegrin: MAB1997) wurde für 1 h bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden mit Tyrode's Puffer gewaschen und dann für 1 h bei 4°C mit dem Sekundärantikörper inkubiert (anti-Ratte Alexa 647) (siehe hierzu J. Lilja et al. 2017). Die Zellen für die Negativ-Kontrolle wurden nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometer (FACS Canto II, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gemessen. Die lebendigen Zellen wurden mittels Vorwärts- (FSC) und Seitwärts- (SSC) Streulicht-Detektoren identifiziert und die APC (Alexa 647) Intensität wurde analysiert.

5 Ergebnisse

5.1 Kolokalisation von Shank3 und HRas in hippocampalen Neuronen

In vorherigen Studien der Arbeitsgruppe Kreienkamp konnte die Interaktion zwischen Shank3 und HRas biochemisch gezeigt werden und festgestellt werden, dass die beiden Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C nicht mit den kleinen Ras-GTPasen Ras und Rap interagieren (Lilja, J. et al. 2017). Um zunächst die subzelluläre Lokalisation von den Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C im Vergleich zu Shank3-WT näher zu untersuchen, wurden hippocampale Neuronen mit diesen Konstrukten transfiziert und immunzytochemisch angefärbt (Abbildung 6).

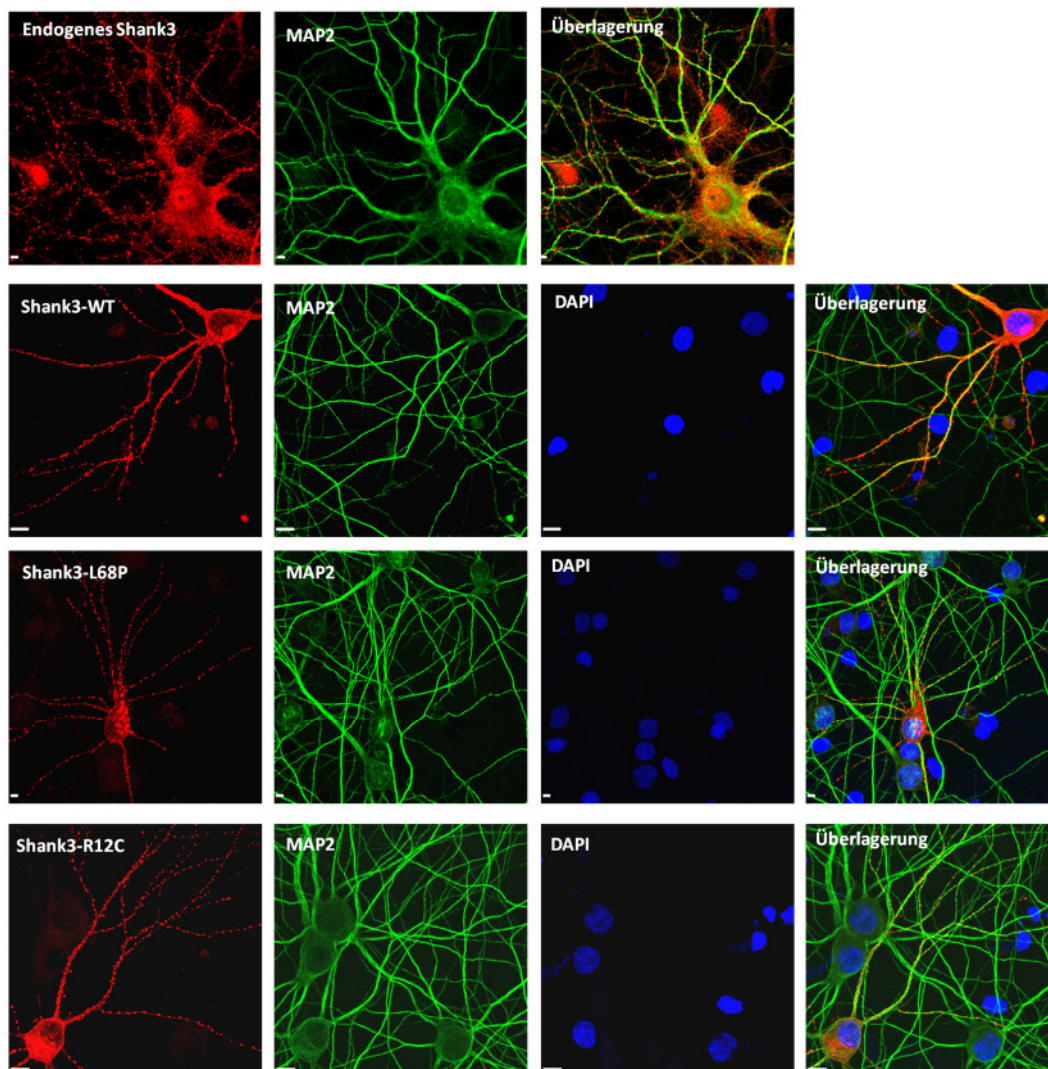


Abbildung 6 Immunzytochemische Analyse der Lokalisation von endogenem Shank3, Shank3-WT und den Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C.

Zur Analyse von endogenem Shank3 wurden untransfizierte Neuronen mit einem spezifischen Shank3-Antikörper (rot), einem Map2-Antikörper (grün) und der Nukleus mittels DAPI (blau) angefärbt. Zur Analyse der Shank3-Mutanten wurden die hippocampalen Neuronen mit Shank3-Expressionsvektoren (Shank3-WT, Shank3-L68P oder Shank3-R12C) transfiziert. Die Shank3-Proteine (rot) wurden unter Verwendung eines myc-Antikörpers angefärbt. Zusätzlich wurden der dendritische Marker Map2 (grün) und der Nukleus mittels DAPI (blau) angefärbt. Skala, 10 μ m.

In Übereinstimmung mit der erwarteten synaptischen Lokalisation zeigten sowohl endogenes Shank3 als auch Shank3-WT eine punktierte Färbung, die geclustert entlang der Dendriten verläuft. Die gefärbten Neuronen, welche die Shank3-L68P oder Shank3-R12C-Mutanten überexprimieren, wurden sowohl mit der endogenen Shank3-Färbung als auch mit dem Shank-3-Wildtyp verglichen. Es konnte festgestellt werden, dass die beiden Mutationen keine Veränderung der jeweiligen Lokalisation der Proteine bewirken. Sowohl Shank3-WT als auch die Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C zeigen eine ähnliche Lokalisation.

Um herauszufinden, wo die Interaktion zwischen Ras und Shank3 in neuronalen Zellen stattfindet, wurde eine entsprechende Kollokalisationsstudie durchgeführt.

Hierfür wurden die Neuronen mit Konstrukten für die Expression von Shank3-WT und HRas-WT transfiziert. Die betreffenden Proteine wurden immunzytochemisch angefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie betrachtet (siehe Abbildung 7).

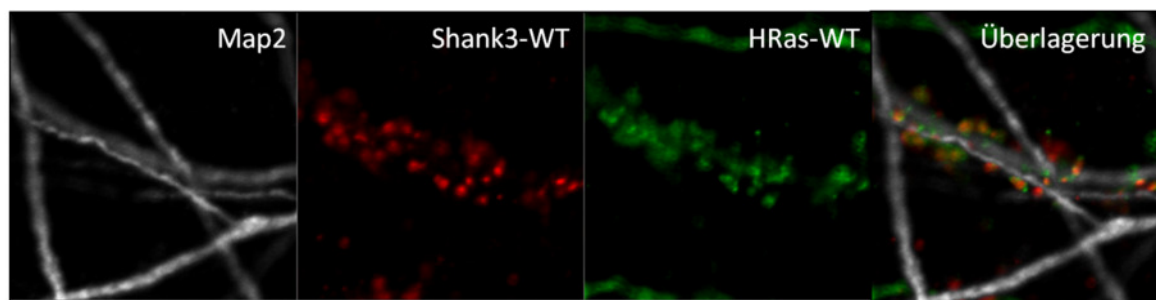


Abbildung 7 Lokalisation von Shank3-WT und HRas-WT in hippocampalen Neuronen.

Gezeigt ist eine starke Vergrößerung eines Shank3-WT- (rot) und HRas-WT- (grün) überexprimierendes hippocampales Neuron. Es wurde zusätzlich der dendritische Marker Map2 (weiß) angefärbt.

Sowohl das Shank3-Protein als auch HRas-WT sind in den dendritischen Dornen der untersuchten Neuronen angereichert. Das HRas-Protein zeigt hierbei eine breitere Verteilung und Anreicherung in den dendritischen Dornen.

5.2 Interaktionsstudie von Shank3 und kleinen G-Proteinen

In den vorhergehenden Experimenten wurde festgestellt, dass die postsynaptische Lokalisation des Shank3-Proteins nicht durch die Mutationen Shank3-L68P und Shank3-R12C beeinflusst wird. Da das kleine G-Protein HRas nur eine partielle Kollokalisation mit dem Shank3-Protein aufweist, stellte sich die Frage, wo Shank3 genau mit den kleinen G-Proteinen HRas und Rap in der Zelle interagiert. Um die Interaktion zwischen Shank3 und kleinen G-Proteinen weiterführend subzellulär zu untersuchen, wurde die bimolekulare Fluoreszenz-Komplementationsmethode (engl. *Bimolecular Fluorescence Complementation Assay*, BiFC), welche auch als split-YFP (engl. *yellow fluorescent protein*, dt. gelb-

fluoreszierendes Protein) bezeichnet wird, verwendet. Hierzu wurden Konstrukte eingesetzt, die zur Expression von Shank3 in Fusion mit der N-terminalen Sequenz von YFP (YN) führen, sowie zur Expression von HRas in Fusion mit der C-terminalen Sequenz von YFP (YC) führen. Das Shank3-Fusionsprotein ist hierbei zusätzlich mit RFP (YN-Shank3-RFP-Konstrukt) und das HRas-Fusionsprotein mit einer HA-Markierung versehen (HA-HRas-YC), so dass auch die einzelnen Fusionsproteine in der Zelle nachgewiesen werden können. Die BiFC-Methode basiert darauf, dass die YFP-Fragmente bei einer Protein-Protein-Interaktion von Shank3 und HRas ein funktionelles YFP erzeugen und die Interaktion subzellulär als YFP-Signal detektiert werden kann (Kerppola 2009; Kodama & Hu 2012; Miller et al. 2015).

Die Interaktion von Shank3 und HRas wurde sowohl immunzytochemisch als auch durchflusszytometrisch mittels Detektion des YFP-Signals untersucht. Zunächst wurde eine immunzytochemische Analyse von HEK293T-Zellen durchgeführt, die mit den Shank3- und HRas-Konstrukten kotransfiziert worden waren. Betrachtet wurden Zellen, die entweder mit Shank-WT, Shank3-L68P oder Shank3-R12C in Kombination mit HRas-WT, der konstitutiv-aktiven HRas-G12V-Mutante oder der dominant-negativen HRas-S17N transfiziert wurden. Dadurch sollte geklärt werden, ob die Bindung zwischen Shank3 und HRas abhängig vom Aktivierungsstatus von HRas ist. In Abbildung 8a ist ein Modell der Interaktion von Shank3- und HRas-Fusionsproteinen gezeigt, und die immunzytochemischen Daten der kotransfizierten HEK293T-Zellen werden in Abbildung 8b dargestellt.

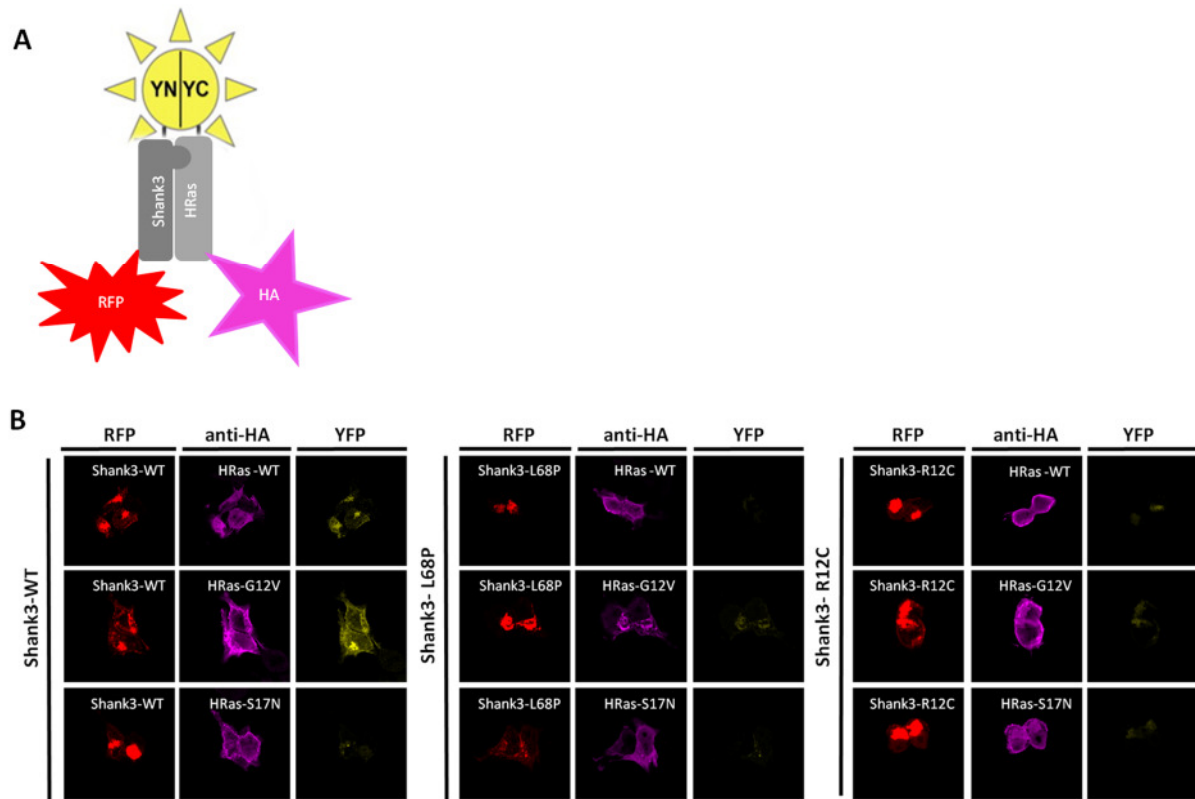


Abbildung 8 Protein-Protein-Bindungsanalyse von Shank3 und HRas mittels immunzytochemischer Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementationsanalyse.

A Modell der Interaktion zwischen den beiden Fusionsproteinen YN-Shank3-RFP und dem HA-markierten HRas-YC. **B** HEK293T-Zellen wurden mit den angegebenen Shank3- und HRas-Konstrukten kotransfiziert. Die mit Shank3-WT transfizierten Zellen zeigen ein starkes YFP-Signal, was auf eine starke Bindung zu HRas-WT und eine noch stärkere Bindung zu der konstitutiv aktiven HRas G12V Mutante hindeutet. Bei den Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C wurde nur ein sehr schwaches YFP-Signal beobachtet.

In der immunzytochemischen Analyse in Abbildung 8 wird die Lokalisation der Shank3-Proteine anhand des detektierten RFP-Signals detektiert, während die Lokalisation der HRas-Proteine mit Hilfe eines anti-HA-Antikörpers und eines sekundären Alexa633-Antikörpers detektiert wurde. Der Ort und die Intensität der Protein-Protein-Bindung zwischen Shank3 und HRas wurde anhand des YFP-Signals ermittelt. Es ist deutlich erkennbar, dass die Shank3-Proteine vermehrt als Aggregate im Zytoplasma der HEK293T-Zellen, die HRas-Proteine dagegen vor allem an der Zellmembran lokalisiert sind. Das detektierte YFP-Signal der HEK293T-Zellen, die mit Shank3-WT und Hras-WT transfiziert worden waren, zeigt, dass die stärkste Protein-Protein-Interaktion von Shank3 und Hras im Zytoplasma stattfindet und zwar in den Bereichen, in denen die Shank3-Proteine angereichert vorkommen. Es gibt allerdings auch in geringerem Maße eine Interaktion der beiden Proteine an der Plasmamembran. Man sieht anhand der hier präsentierten Daten deutlich, dass Shank3-WT mit HRas-WT und noch stärker mit der konstitutiv aktiven Mutante HRas-G12V interagiert, während bei der dominant-negativen HRas-S17N-Mutante kaum ein YFP-Signal detektiert

werden konnte. Des Weiteren besteht ein deutlich sichtbarer Unterschied der Signalintensität zwischen Shank3-WT und den mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziierten Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C. Um eine erweiterte quantitative Aussage über die Interaktion von Shank3 und HRas treffen zu können, wurden die kotransfizierten HEK293T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurden nur die lebenden Zellen, die ein RFP-Signal aufwiesen und somit erfolgreich transfiziert worden waren, ausgewählt und die mittlere YFP-Signalintensität dieser Zellen bestimmt. In Abbildung 9 werden Shank3-WT, Shank-L68P oder Shank3-R12C-transfizierte Zellen betrachtet, die entweder HRas-WT, HRas-G12V oder HRas-S17N-Varianten koexprimieren. Diese Analyse erlaubt im Gegensatz zur Immunzytochemie eine quantitative Auswertung der YFP-Bildung und damit indirekt der Proteininteraktionen zwischen Shank3 und HRas-Proteinen.

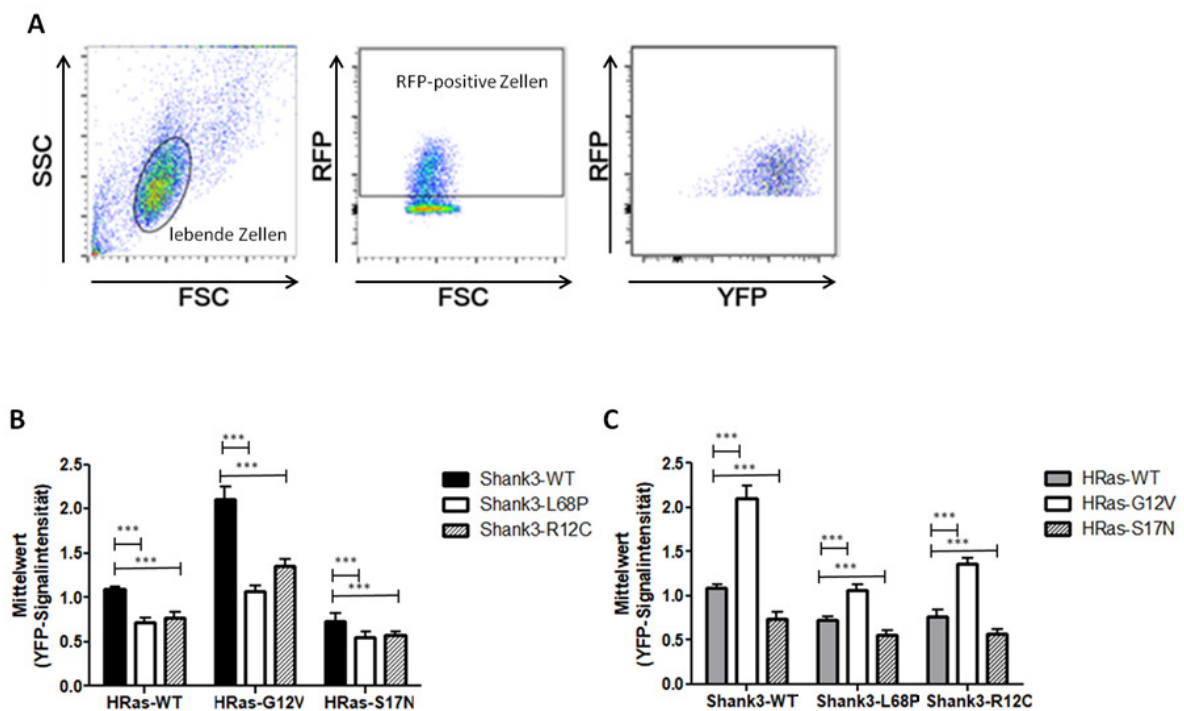


Abbildung 9 Durchflusszytometrische Auswertung der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation durch Shank3 und HRas.

A Kotransfizierte HEK293T-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei wurden mittels Vorwärts- (engl. *Forward Scatter*, FSC) und Seitwärts (engl. *Side Scatter*, SSC)-Streulicht die lebenden Zellen identifiziert und ausschließlich die RFP-positiven Zellen bei der Analyse der mittleren YFP-Signalintensität betrachtet. Diese Abbildung zeigt beispielhaft die Vorgehensweise der Analyse. **B+C** Beide Graphen zeigen den gleichen Datensatz in unterschiedlicher Form dargestellt. Die angegebenen Shank3- und HRas-Varianten wurden in HEK293T-Zellen koexprimiert und gemäß **A** analysiert. Die mittlere YFP-Signalintensität wurde auf den Mittelwert normalisiert (***) $p < 0,001$, sehr signifikanter Unterschied, TWO-WAY-ANOVA-Test mit Bonferroni-Post-Hoc-Test; $n=7$).

Die Daten zeigen, dass die Koexpression von Shank3-WT und HRas-WT im Vergleich zur dominant-negativen Mutante HRas-S17N eine deutlich höhere YFP-Signalintensität verursacht und die Interaktion zwischen Shank3-WT und HRas-G12V gemessen an der mittleren YFP-Signalintensität doppelt so viel YFP-Signal wie HRas-WT erzeugt. Dahingegen

führen die Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C zu einer sehr viel geringeren YFP-Signalintensität als Shank3-WT. In Koexpression mit HRas-G12V ist die mittlere YFP-Signalintensität bei Shank3-R12C im Vergleich zu Shank3-WT um 25% reduziert, während die Koexpression von Shank3-L68P die mittlere YFP-Signalintensität sogar um 50% reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die Mutation Shank3-L68P sich noch stärker auf die Bindung zwischen Shank3 und Hras auswirkt als es die Mutation Shank3-R12C tut.

Die beiden Mutationen Shank3-L68P und Shank3-R12C betreffen die Shank3-SPN-Domäne und stören wie bereits diskutiert die Bindung zwischen Shank3 und kleinen G-Proteinen wie HRas. Die vorherigen Immunpräzipitationsergebnisse der Arbeitsgruppe Kreienkamp, die gezeigt haben, dass Shank3-WT die konstitutiv aktive Variante von HRas bindet und die Mutationen Shank3-L68P und Shank3-R12C hinsichtlich der Bindungsaffinität zu HRas zu einem molekularen Defekt führen, konnten immunzytochemisch bestätigt werden.

Diese Form der Analyse wurde ebenfalls bei Koexpression mit der konstitutiv aktiven Rap1-G12V-Variante durchgeführt. Das Rap1-Protein gehört zur Familie der Ras-Proteine und wurde ebenso wie HRas als Interaktionspartner von Shank3 identifiziert. Die Immunpräzipitation hatte gezeigt, dass nicht nur Ras, sondern auch Rap1a und Rap1b an Shank3-WT binden und diese Bindung von den Mutationen L68P und R12C gestört wird. Bei der bimolekularen Fluoreszenzanalyse wurden diese Resultate nun durchflusszytometrisch überprüft (siehe Abbildung 10).

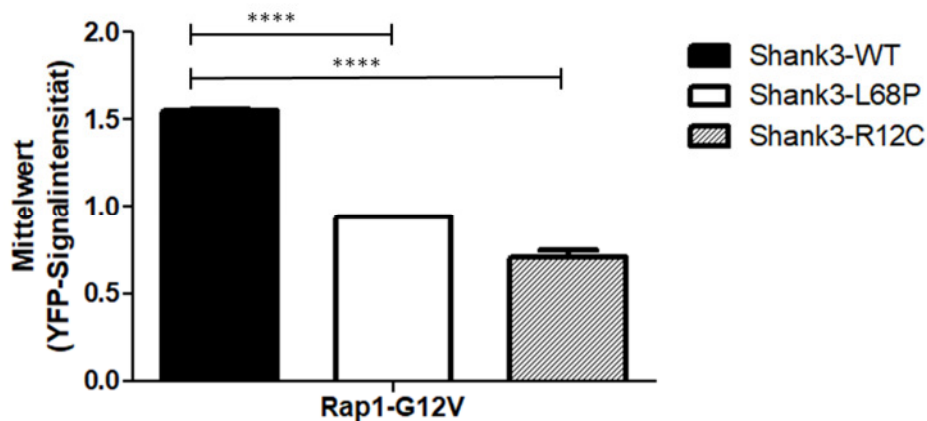


Abbildung 10 Protein-Protein-Bindungsanalyse von Shank3 und Rap1 mittels durchflusszytochemischer Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementationsanalyse.

Die YFP-N-Shank3-Varianten wurden mit YFP-C-Rap1-G12V in HEK293T-Zellen koexprimiert, und die Zellen wurden wie in Abbildung 9 analysiert. Die Daten wurden auf den Mittelwert normalisiert (**** $p < 0,0001$, sehr signifikanter Unterschied, TWO-WAY-ANOVA-Test mit Bonferroni-Post-Hoc-Test; $n=4$).

Im Vergleich zu dem bimolekularen Fluoreszenz-Komplementationsexperiment von Shank3 und HRas war die YFP-Signalintensität in dieser Analyse von Shank3 und Rap1-G12V sehr

viel geringer. Dies ist vermutlich dadurch zu erklären, dass das Fusionsprotein von Rap1-G12V mit dem C-terminalen Part von YFP in geringerer Menge exprimiert wurde als die HRas-Fusionsproteine in den vorherigen BiFC-Experimenten. Die immunzytochemische Analyse dieser Rap1-G12V- und Shank3-koexprimierenden Zellen war daher nicht sinnvoll; allerdings konnten die Zellen zuverlässig und präzise mittels der sensitiveren durchflusszytometrischer Analyse ausgewertet werden.

Dabei zeigte sich, dass Shank3-WT und Rap1-G12V miteinander interagieren und diese Bindung sehr signifikant von den Shank3-Mutationen L68P und R12C gestört wird. Die YFP-Signalintensität wurde bei Expression von Shank3-L68P um 39,4% im Vergleich zum Wildtyp reduziert und bei der Shank3-R12C-Mutante um 55,0% reduziert, dies bei einem statistischen Signifikanzniveau von $p < 0,0001$.

5.2 Etablierung eines Systems zur spezifischen Aktivierung des Ras-Proteins an der Synapse

Nun stellte sich die Frage, welche Funktion diese Interaktion zwischen Shank3 und Ras-Proteinen in Neuronen hat. Zunächst wurde versucht, Shank3 gemeinsam mit aktiven bzw. dominant-negativen Varianten von Ras und Rap in Neuronen zu exprimieren. Da die Koexpression von Shank3 und Ras in Neuronen aufgrund von morphologischen Veränderungen und vermehrtem Zelltod schwierig war, konnte basierend auf der Überexpression dieser Proteine in Neuronen kein robuster Test zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Ras- und Shank3-Interaktion etabliert werden. Eine Alternative ist die Herunterregulation (engl. *Knockdown*) eines Ras-GTPase-aktivierenden Proteins (GAP), so dass Ras vermehrt als aktives GTP-gebundenes Ras-Protein vorliegt. Daher wurde eine Herunterregulation von SynGAP durchgeführt. SynGAP ist ein Ras-GTPase-aktivierendes Protein, welches in den exzitatorischen Synapsen im Gehirn angereichert ist (Myung et al. 2005). Dazu wurde ein lentiviraler Vektor generiert, der die Expression einer SynGAP-spezifischen shRNA ermöglicht. In HEK293T-Zellen wurde der entsprechende *Knockdown*-Virus und ein Kontroll-Virus hergestellt. Um die Effizienz des SynGAP-*Knockdown*-Virus zu testen, wurden cortikale Neuronen mit unterschiedlichen Mengen des Virus infiziert und das Lysat im Immunblot mit einem SynGAP-spezifischen Antikörper untersucht (siehe Abbildung 10).

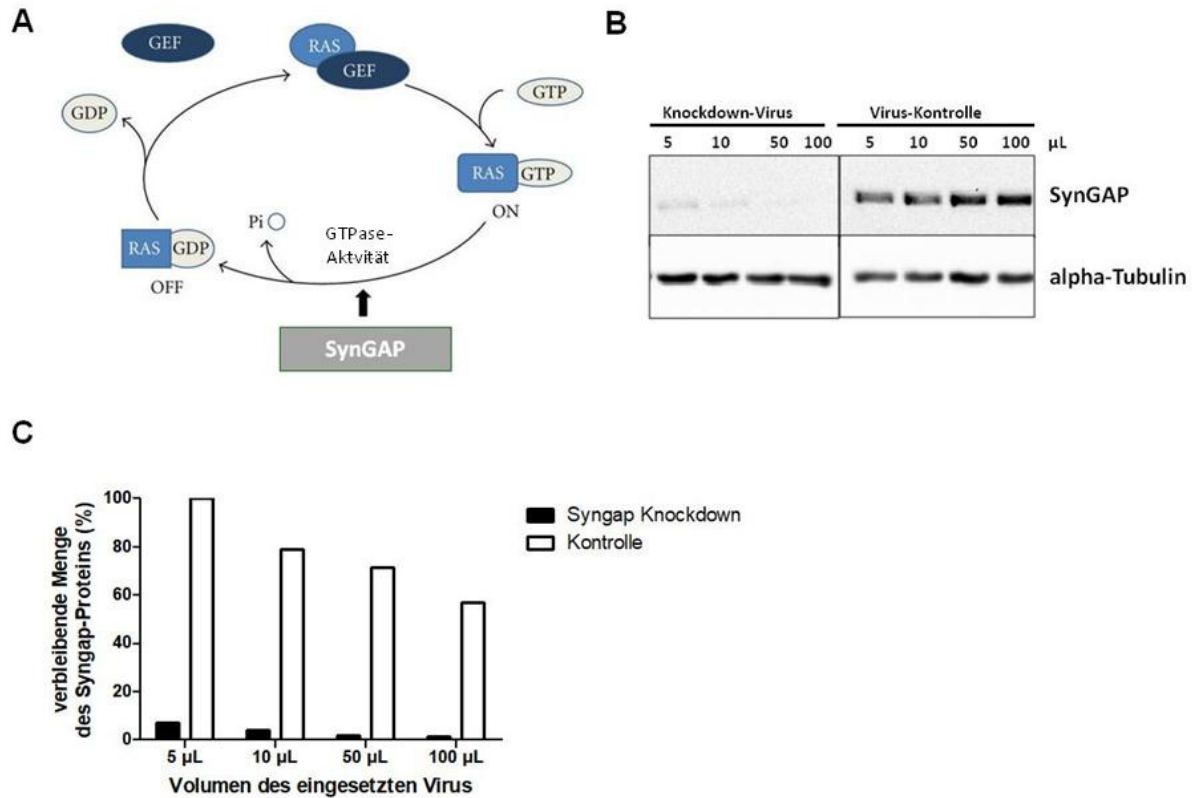


Abbildung 11 Analyse von mit SynGAP-Knockdown-Virus infizierten corticalen Neuronen mittels Immunblot zur Untersuchung der Effizienz.

A Modell für die Umwandlung von der aktiven, GTP-gebundenen Ras-Variante zur inaktiven, GDP-gebundenen Ras-Form durch SynGAP. **B** Cortikale Neuronen wurden mit unterschiedlichen Mengen SynGAP-Knockdown- oder Kontrollvirus infiziert; Zelllysate wurden im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. **C** Der in **B** gezeigte Immunoblot wurde hinsichtlich der verbleibenden SynGAP-Proteinmenge analysiert und graphisch dargestellt.

Schon eine Infektion mit 5 µL des SynGAP-Knockdown-Virus führte zu einer Reduktion der SynGAP-Proteinmenge um 92,7%. Dieser Wert zeigt, dass es sich um eine sehr effiziente Methode zur Herunterregulation von SynGAP handelt. Aufgrund der Tatsache, dass sehr hohe Konzentrationen des Virus die Vitalität der Zellen beeinflussen, wurden bei weiteren Versuchen ausschließlich 5 µL Virus eingesetzt.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob die Infektion von corticalen Rattenneuronen mit dem SynGAP-Knockdown-Virus zu einer signifikanten Aktivierung des Ras-Proteins führt. Hierzu wurde das Lysat von zuvor infizierten corticalen Rattenneuronen mittels spezifischer Antikörper untersucht, um zu überprüfen, ob die Ras-vermittelte Aktivität der MAP-Kinase Erk erhöht ist. Ein Maß für die MAPK-Aktivität ist das Verhältnis von phosphoryliertem Erk (phospho-Erk) zu der Gesamtmenge von Erk (Erk) (siehe Abbildung 12).

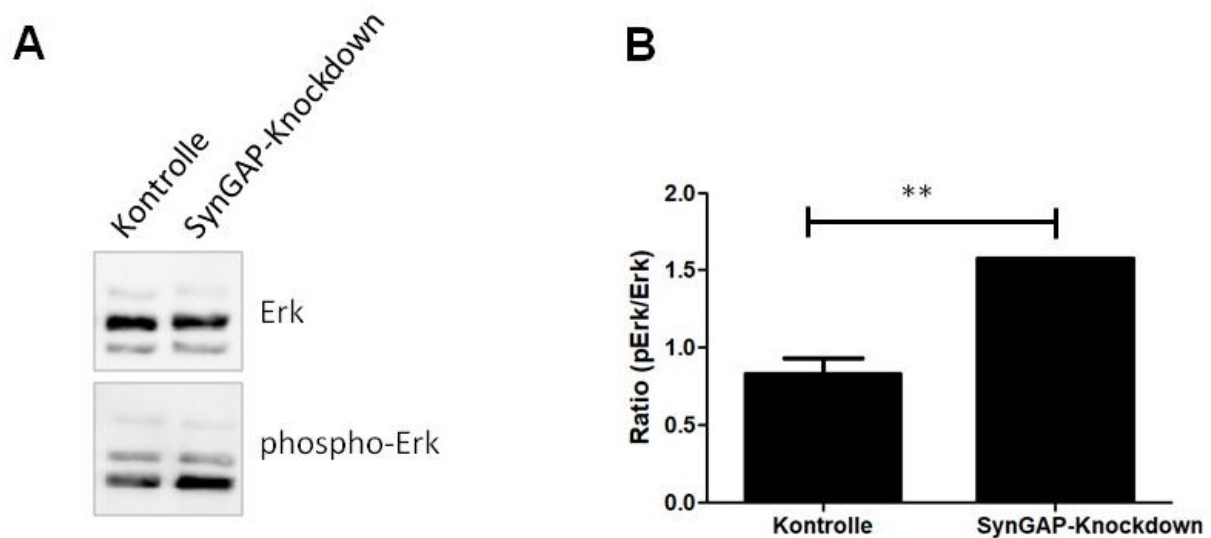


Abbildung 12 Untersuchung der MAP-Kinase-Aktivität von cortikalen Ratten-Neuronen nach Infektion mit einem SynGAP-Knockdown-Virus.

A Cortikale Neuronen wurden mit SynGAP-Knockdown- oder Kontroll-Virus infiziert und die Lysate wurden mittels spezifischer Antikörper gegen phosphoryliertes Erk und dem Gesamtprotein von Erk analysiert. **B** Es wurde das Verhältnis von phospho-Erk zu Gesamt-Erk kalkuliert, um die MAP-Kinase-Aktivität von Erk zu bestimmen. Der Unterschied der MAPK-Aktivität zwischen SynGAP-Knockdown-Virus-infizierten Neuronen und den Kontrollvirus infizierten Neuronen wurde mittels ungepaartem T-Test analysiert und ist signifikant (** $p < 0,01$; $n=2$).

Die Analyse der MAPK-Aktivität der mit dem SynGAP-Knockdown-Virus infizierten Neuronen im Vergleich zu Neuronen, die mit einem Kontroll-Virus infiziert worden waren, zeigte, dass der Verlust von SynGAP zu einer signifikanten Erhöhung der MAPK-Aktivität führt. Somit ist bewiesen worden, dass die Herunterregulation von SynGAP zu einer gesteigerten Ras-Aktivität führt. Dies ist ein vielversprechender Ansatz zur Untersuchung des Shank3-Proteins nach Aktivierung von synaptisch lokalisierten Ras-Proteinen.

5.3 Untersuchung des Einflusses der Rap-Aktivierung auf die Lokalisation von Shank3 in hippocampalen Neuronen

Zur weiteren funktionellen Analyse der Interaktion von Shank3 und dem kleinen G-Protein Rap wurde untersucht, ob die Rap-Aktivierung zu einer Veränderung der Shank3-Verteilung in hippocampalen Neuronen führt. Zur Rap-Aktivierung wurde 8-(4-Chlorophenylthio)adenosin-3',5'-cyclisches Monophosphat (8-CPT-cAMP) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein cAMP-Analogon, welches den Guanin-Austauschfaktor (GEF) Epac2 spezifisch stimuliert. Hierdurch wird die Menge an GTP-gebundenem, aktivem Rap gesteigert (Woolfrey et al. 2010). Nach der Behandlung mit 8-CPT wurde immunzytochemisch analysiert, ob Shank3 bei Rap-Aktivierung vermehrt an die Synapse rekrutiert wird. Hierzu wurden die Neuronen von Shank3-defizienten Mäusen (E16) nach 7 Tagen in Kultur mit einem Shank3-WT-Konstrukt transfiziert und nach 14 Tagen in Kultur wurden die Neuronen für 60 Minuten mit 8-CPT behandelt und anschließend fixiert. Die Neuronen wurden immunzytochemisch für Shank3, den dendritischen Marker Map2 und den präsynaptischen Marker vGlut gefärbt, und anschließend mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Hierbei wurden von jedem Neuron fünf Abschnitte der Dendriten betrachtet und mittels ImageJ-Fiji-Software hinsichtlich der Shank3-Signalstärke in dendritischen Dornen und dendritischem Schaft an jeweils fünf Regionen untersucht. In Abbildung 13 sind beispielhafte immunzytochemische Färbungen der Shank3-WT-überexprimierenden Maus-Neuronen und die Analyseergebnisse der Shank3-Signalstärke von dendritischen Dornen, dendritischem Schaft und dem Verhältnis dieser beiden Signalstärken gezeigt. Es wurden 8-CPT-behandelte und unbehandelte Zellen miteinander verglichen (siehe Abbildung 13).

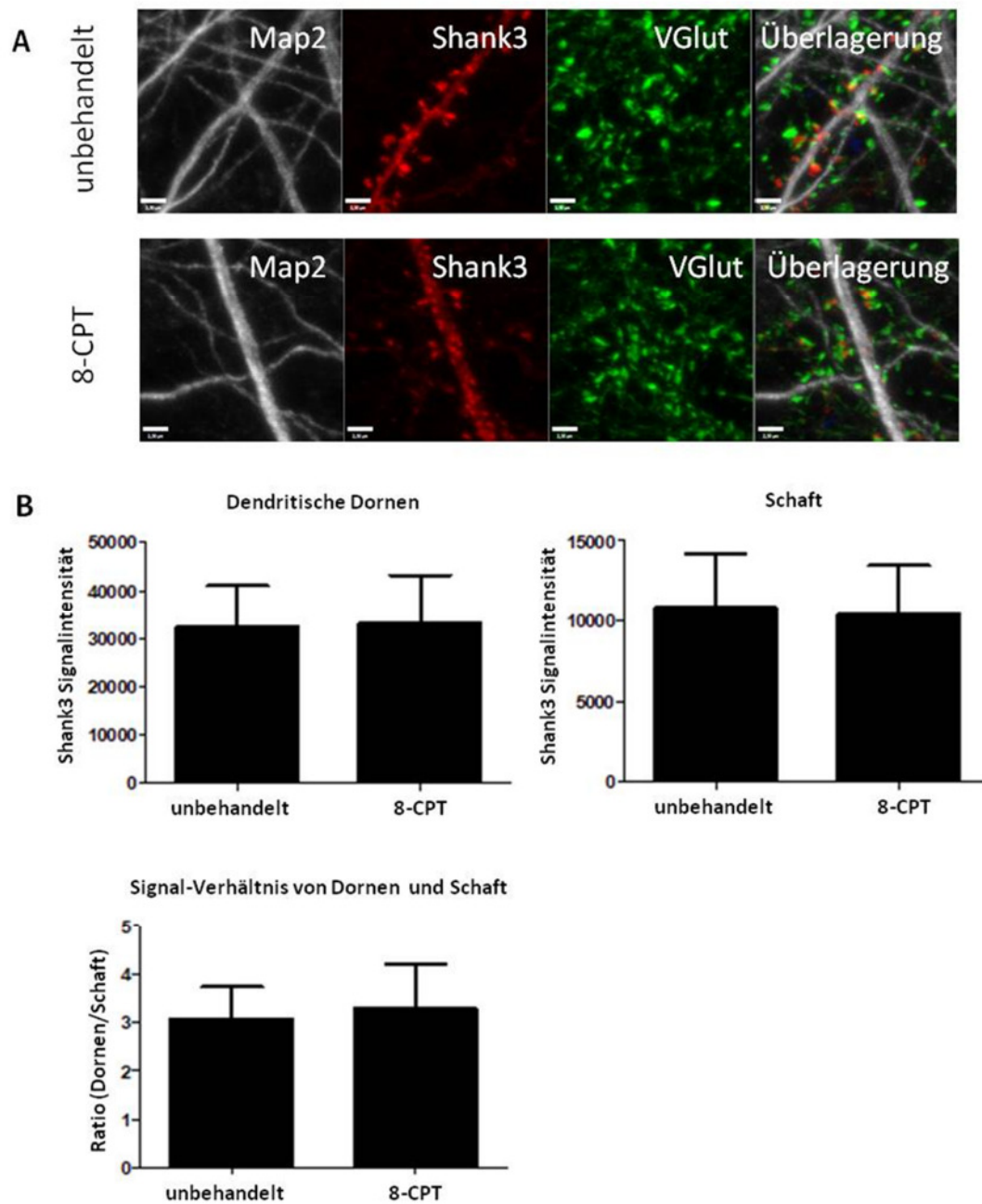


Abbildung 13 Analyse der Shank3-Lokalisation in Abhängigkeit von der Rap-Aktivierung mittels 8-CPT.

Die hippocampalen Neuronen von Shank3-defizienten Mäusen (E16) wurden mit einem Expressionskonstrukt für Shank3-WT-myc transfiziert. Shank3-WT (rot), der präsynaptische Marker VGlut (grün) und der dendritische Marker Map2 (weiß) wurden mittels spezifischer Antikörper angefärbt. Es wurde die Signalstärke von Shank3 in den dendritischen Dornen und im dendritischen Schaft mittels ImageJ-Fiji analysiert, indem die Signalintensität von jeweils fünf Regionen (engl. *Region of Interest*, ROI) gemessen wurde. Die Kalkulation des Verhältnisses der Signalstärken von Dornen und Schaft ist ein Maß für eine Verteilungsänderung des Shank3-Proteins und zeigt in einem ungepaarten T-Test keinen signifikanten Unterschied (n=25).

Die Analyse der Shank3-Signalstärke von dendritischen Dornen und dendritischem Schaft zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen 8-CPT-behandelten und unbehandelten Mausneuronen gibt. Dies bedeutet, dass die Behandlung von Shank3-

defizienten Mausneuronen zu keiner veränderten Rekrutierung des Shank3-Proteins an die Synapse führte.

5.4 Untersuchung von Konformationsänderungen im N-terminalen Bereich von Shank3

Die Arbeitsgruppe von Prof. Kreienkamp hatte 2013 eine intramolekulare Interaktion zwischen der N-terminalen SPN-Domäne, und der ARR-Domäne nachgewiesen (Mameza et al. 2013). Diese intramolekulare Bindung wurde durch die Shank3-L68P-Mutante blockiert; dies ermöglicht eine intermolekulare Bindung zwischen der ARR-Domäne und Interaktionspartnern der ARR.

Um die intramolekulare Bindung zwischen Shank3-SPN und ARR-Domäne näher zu untersuchen, wurden Konstrukte generiert, die die codierenden Sequenzen für die ersten 375 Aminosäuren von Shank3 und für GFP und mCherry beinhalten. Hierbei flankieren die N-terminale GFP- und die C-terminale mCherry-Sequenz die N-terminalen Domänen von Shank3. Es wurden sowohl Shank3-WT als auch R12C und L68P-Mutanten erzeugt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich GFP und mCherry bei einer intramolekularen Bindung von SPN- und ARR-Domäne so nahe kommen, dass man einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) mittels konfokaler Mikroskopie oder Durchflusszytometrie messen kann.

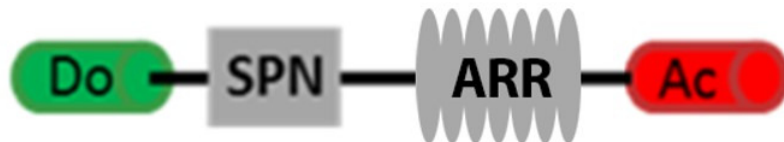


Abbildung 14 Schematische Darstellung des GFP-SPN-ARR-mCherry-Konstrukts, bei dem GFP als Donor und mCherry als Akzeptor fungiert.

GFP wird angeregt und bei geringer räumlicher Distanz zwischen GFP und mCherry findet ein Fluoreszenz-Energie-Transfer (FRET) auf das mCherry-Fluorophor statt, so dass eine mCherry-Emission detektiert werden kann.

Für die Analyse der Konformationsänderung von Shank3 in Abhängigkeit von der Ras-Bindung wurden HEK293T-Zellen mit den entsprechenden GFP-Shank3-mCherry-Konstrukten (Shank3-WT, Shank3-L68P, Shank3-R12C) und HRas-WT kotransfiziert und in einem Lebendzellmikroskopie-Experiment wurde eine FRET-Analyse während einer 20-minütigen EGF-Stimulation durchgeführt, um den Einfluss der Ras-Aktivierung auf die Shank3-Konformation zu testen (siehe Abbildung 15).

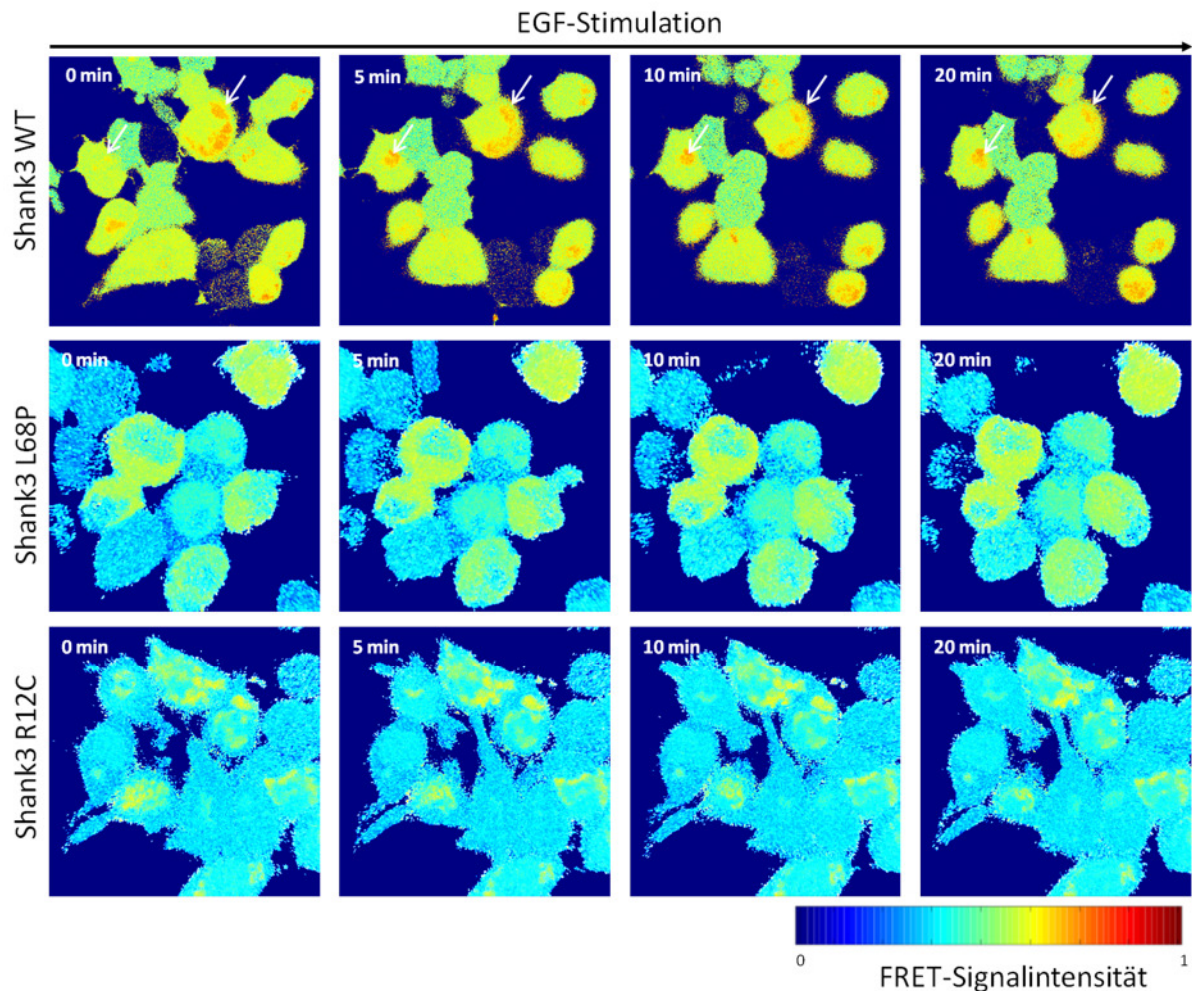


Abbildung 15 Analyse des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers bei HEK293T-Zellen, die mit GFP-Shank3-mCherry-Konstrukten (WT, L68P, R12C) und HRas-WT kotransfiziert wurden, zur Untersuchung der Konformationsänderung von Shank3 in Abhängigkeit von der Ras-Aktivierung.

Bei dem Experiment wurde GFP angeregt und die Emission von mCherry gemessen. Die Daten wurden mit der Imaris-Software prozessiert und die FRET-Signalstärke wurde farbkodiert in 256 Farben dargestellt; hierbei entspricht die dunkelblaue Farbe einem niedrigem FRET-Signal (FRET=0) und die dunkelrote Farbe einem sehr hohen FRET-Signal (FRET=1). Eine hohe FRET-Signalstärke deutet auf eine geschlossene Konformation von Shank3 hin während eine niedrige FRET-Signalstärke eine offene Konformation von Shank3 bedeutet.

Die FRET-Analyse der mit GFP-Shank3-mCherry und HRas-WT-transfizierten HEK293T-Zellen zeigt, dass Shank3-WT im Vergleich zu den Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C eine deutlich höhere FRET-Signalintensität und somit mehr intramolekulare Bindungen aufweist. Des Weiteren konnte auch im Lebendzell-Experiment gezeigt werden, dass die FRET-Signalintensität durch EGF-Stimulation beeinflussbar ist. Man kann deutlich anhand der Regionen mit hoher FRET-Signalintensität sehen, dass sich über die Zeit nach EGF-Stimulation die Verteilung der Regionen mit hoher FRET-Signalintensität ändert. Die FRET-Signalintensität nimmt in Abhängigkeit von der EGF-Stimulation in manchen Regionen ab, während in anderen Regionen neue Areale mit hoher FRET-Signalintensität entstehen. Bei den beiden Shank3-Mutanten hat die Stimulation hingegen keine Auswirkungen auf das

Muster der FRET-Signalintensitäten. Daraus lässt sich schließen, dass Shank3-WT zur intramolekularen Bindung zwischen SPN- und ARR-Domäne fähig ist, während dies bei den Mutanten nicht der Fall ist, und, dass die Konformation von Shank3-WT durch die Stimulation von Ras kurzfristig verändert wird.

Zur quantitativen Untersuchung der FRET-Signalintensität wurden mit GFP-Shank3-mCherry und HRas-Konstrukten kotransfizierte HEK293T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dieser Messung liegt das gleiche Prinzip wie bei der vorherigen immunzytochemischen Messung zugrunde; es wurde das GFP angeregt und die Emission des mCherry-Signals gemessen. Es wurde untersucht, welchen Einfluss die Koexpression von Hras-WT, Hras-G12V und H-Ras-S17N auf die intramolekulare Bindung zwischen SPN- und ARR-Domäne hat, indem die mittlere FRET-Signalintensität bestimmt wurde. Zusätzlich wurde der Effekt der Ras-Aktivierung mittels EGF-Stimulation untersucht (siehe Abbildung 16).

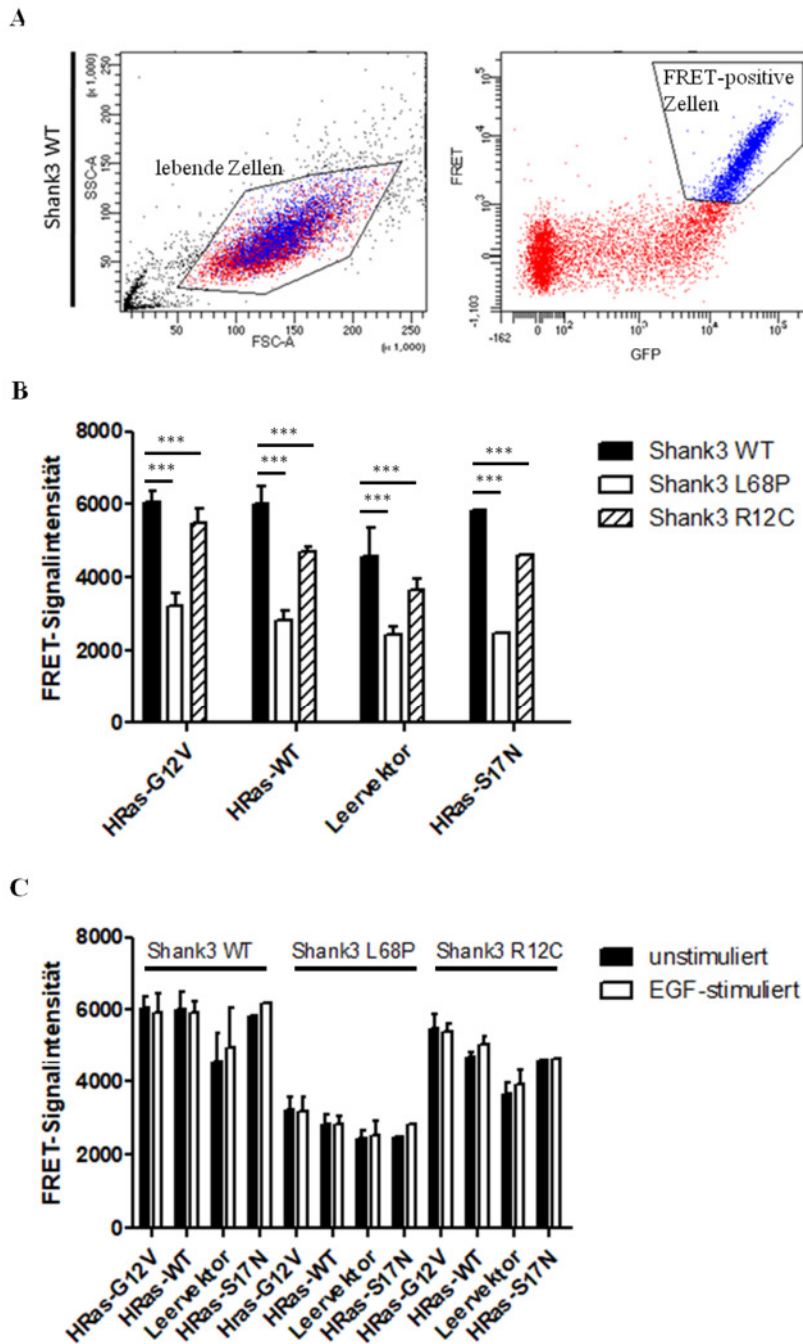


Abbildung 16 Durchflusszytometrische Messung der FRET-Signalintensität bei HEK293T-Zellen, die mit GFP-Shank3-mCherry-Konstrukten transfiziert wurden.

A Bei dem durchgeführten durchflusszytometrischen Experiment wurden Shank3-transfizierte Zellen analysiert, die mit HRas-WT, HRas-G12V, HRas-S17N oder dem Leervektor kotransfiziert worden waren. Anhand des Vorwärts- (FSC) und Seitwärts-(SSC) Streulicht wurden die lebenden Zellen identifiziert. Anschließend wurde die mittlere FRET-Signalintensität der transfizierten Zellen gemessen. **B** Die Daten zur mittleren FRET-Signalintensität der kotransfizierten HEK293T-Zellen wurden graphisch dargestellt. Es wurden signifikante Unterschiede zwischen Shank3-WT und den Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C festgestellt (TWO-WAY-ANOVA Test, Bonferroni-Post-Hoc-Test, *** $p < 0,001$, $n=4$). **C** In diesem Experiment wurde untersucht, ob die Aktivierung von HRas via EGF-Stimulation einen Effekt auf die Konformation von Shank3 hat. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen EGF-stimulierten und unstimulierten Zellen detektiert werden (TWO-WAY-ANOVA Signifikanztest, keine Signifikanz).

Die durchflusszytometrische Analyse der mit GFP-Shank3-mCherry und HRas-Konstrukten transfizierten HEK293T-Zellen zeigt, dass Shank3-WT im Vergleich zu den Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C eine signifikant höhere FRET-Signalintensität aufweist. Die Koexpression von HRas-WT und der konstitutiv aktiven HRas-G12V-Mutante bewirkte im Vergleich zu der Kotransfektion mit dem Leervektor oder der dominant-negativen HRas-S17N-Mutante nur eine geringfügige Erhöhung der FRET-Signalintensität. Des Weiteren hatte die Stimulation mit EGF keinen Effekt auf die Gesamt-FRET-Signalintensität. Somit konnte anhand der durchflusszytometrischen Daten nachgewiesen werden, dass Shank3-WT eine starke intramolekulare Bindung zwischen SPN- und ARR-Domänen aufweist, während die intramolekulare Bindung bei Shank3-R12C reduziert und bei Shank3-L68P stark reduziert ist. In der durchflusszytometrischen Analyse konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, dass HRas-Aktivität einen Einfluss auf die FRET-Signalintensität und somit auch auf die Konformation von Shank3 hat. Dies zeigt, dass trotz der Verteilungsänderung der Signale hoher FRET-Intensität (die in der mikroskopischen Analyse beobachtet wurde) die FRET-Gesamtintensität nicht verändert ist. Somit scheint die HRas-Aktivität dafür verantwortlich zu sein, dass intramolekulare Bindungen aufgelöst werden und neue intra- und intermolekulare Bindungen von Shank3-Proteinen eingegangen werden können. Dies ist ein erster Hinweis auf dynamische Veränderungen im Shank3-Protein nach Aktivierung von Ras.

5.5 Untersuchung der Proteinmenge von Ras-Proteinen in der postsynaptischen Dichte bei Verlust von Shank3

Um zu untersuchen, ob Ras durch die Bindung an Shank3 vermehrt an die postsynaptische Dichte rekrutiert wird, wurde die postsynaptische Dichte aus Gehirnen von WT und Shank3-Knockout-Mäusen isoliert. Bei diesen Mäusen handelt es sich um ProSAP2/Shank3 $\alpha\beta^{-/-}$ Mäuse, die nur die Shank3-Isoformen exprimieren, die keine SPN- und ARR-Domäne enthalten. Dieses Mausmodell ist daher ideal, um gezielt zu untersuchen, inwiefern die Menge an Ras-Proteinen von dem Verlust der Shank3-Isoformen mit einer SPN-Domäne beeinflusst wird. Bei der Untersuchung wurden Proteinlysate der postsynaptischen Dichte mittels spezifischer Antikörper für die Shank3-Isoformen und die Ras-Proteine (HRas, KRas, NRas) analysiert und die Shank3-Proteinmenge normalisiert auf die Menge von alpha-Tubulin (siehe Abbildung 17).

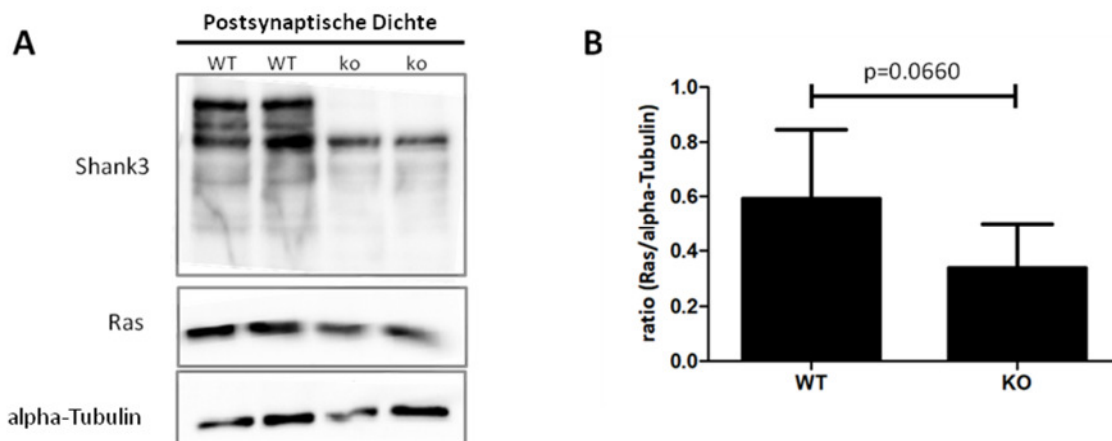


Abbildung 17 Analyse der postsynaptischen Dichte von Shank3-WT und Shank3 $\alpha\beta^{-/-}$ -Mäusen bezüglich der Menge von Ras-Proteinen.

A Die Postsynaptische Dichte wurde aus Vorderhirn-Lysat isoliert. Die Shank3-Isoformen und Ras-Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper detektiert. Shank3-defiziente Mäuse (Shank3-Knockout; KO) zeigen einen Verlust der Shank3-Isoformen, welche die SPN-Domäne aufweisen. **B** Die Menge an Ras-Proteinen wurde quantifiziert und normalisiert auf die Menge von alpha-Tubulin (n=6, ungepaarter T-Test, $p=0,066$).

Anhand des Immunblots ist erkennbar, dass nur die langen Isoformen von Shank3 bei der Shank3-defizienten Maus fehlen. Des Weiteren wurde die Menge an Ras-Proteinen quantifiziert und festgestellt, dass ein geringer, aber nicht signifikanter Unterschied zwischen Shank3-WT und -KO-Tieren zu sehen ist. Die Shank3-defizienten Mäuse weisen geringfügig weniger Ras-Proteine als die WT-Mäuse in der postsynaptischen Dichte auf. Es wurde somit keine Schlüsselrolle von Shank3 bei der Rekrutierung von Ras-Proteinen (HRas, KRas, NRas) an die postsynaptische Dichte nachgewiesen. Da es keine verlässlichen Antikörper für die einzelnen Ras-Proteine gibt, konnte nicht untersucht werden, ob mögliche Unterschiede der einzelnen Ras-Proteine (HRas, KRas oder NRas) hinsichtlich der Rekrutierung zur Synapse via Shank3-Bindung bestehen. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die SPN-Domäne des an der postsynaptischen Dichte hochregulierten Shank1-Proteins (Schmeisser et al. 2012) bei Shank3-defizienten Mäusen die Funktion der Rekrutierung von Ras-Proteinen übernimmt.

5.6 Analyse der Ras-vermittelten MAPK- und PI3K-Signalwege bei Verlust von Shank3

Zur weiteren funktionellen Analyse der nachgewiesenen Shank3-Ras-Interaktion wurden Ras-vermittelte Signalwege betrachtet, um zu klären, ob die Interaktion dieser beiden Proteine einen Einfluss auf die Aktivität dieser Signalwege hat. Es wurde untersucht, ob die bekannten MAP-Kinase- und PI3K/Akt- Signalwege, welche durch Ras vermittelt werden (Borrie et al. 2017; Castellano & Downward 2011), durch den Verlust von Shank3 beeinflusst werden. Vorherige Ergebnisse der Arbeitsgruppe Kreienkamp haben gezeigt, dass die Überexpression von Shank3-WT die Aktivierung des MAPK-Signalweges durch aktives HRas in HEK293T-

Zellen hemmt. Diese Hemmung kann nicht durch die beiden Shank3-Mutanten L68P und R12C erreicht werden (unpublizierte Daten). In dieser Analyse wurden nun Shank3-Wildtyp- und Shank3-defiziente Mäuse bezüglich der Aktivität der Ras-vermittelten MAPK- und PI3K/Akt-Signalwege überprüft, um eine Aussage darüber machen zu können, ob Shank3 *in vivo* einen Einfluss auf diese Signalwege hat. Aufgrund der *in vitro* Daten wurde vermutet, dass Shank3 den MAPK-Signalweg als Negativregulator beeinflusst. Eine mögliche Hypothese hierbei ist, dass Shank3-WT an das GTP-gebundene Ras-Protein bindet und es daran hindert seine Funktion im MAPK- und PI3K/Akt-Signalweg auszuführen. Somit wurde vermutet, dass Shank3-defiziente Mäuse eine erhöhte Aktivität bei Ras-vermittelten Signalwegen zeigen würden. Die Aktivität des MAPK-Signalweges wurde mittels phospho-Erk und Erk-Antikörpern und die Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges mittels phospho-Akt und Akt-Antikörpern bei Verwendung von Vorderhirn-Lysat bestimmt. Der Phosphorylierungsstatus wurde aus dem Quotienten aus phosphorylierter und Gesamtmenge des Signalproteins berechnet (siehe Abbildung 18).

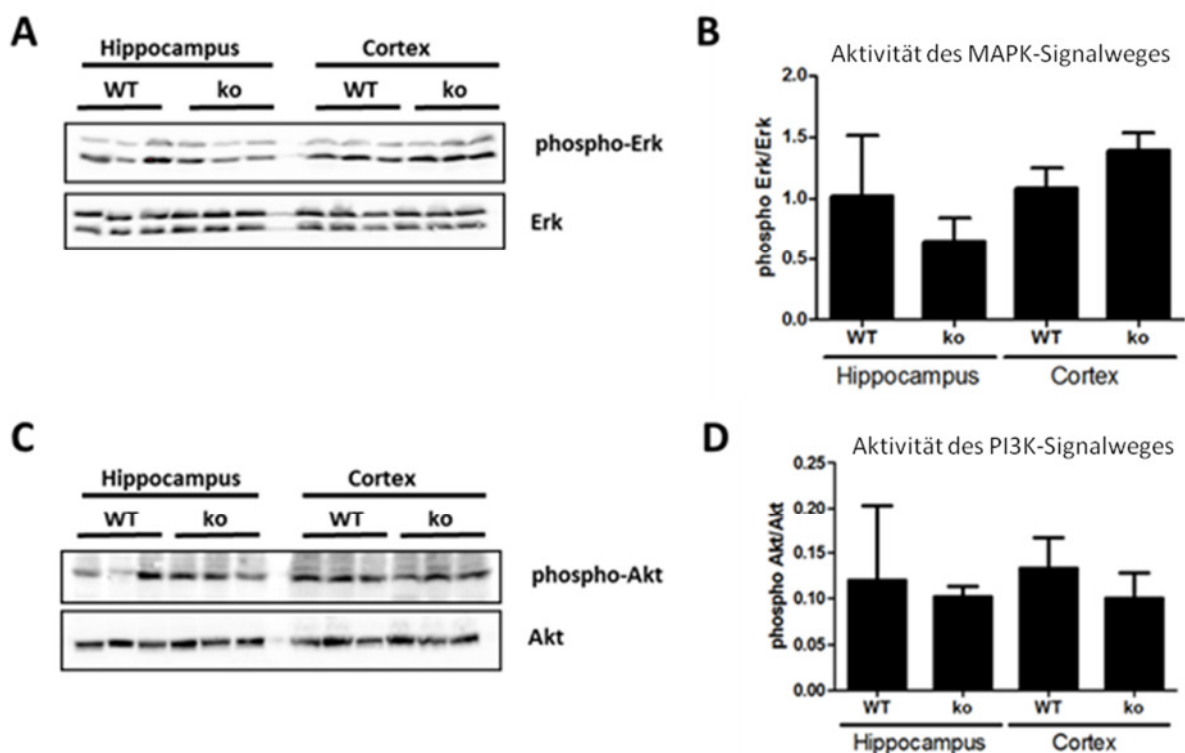


Abbildung 18 Aktivität der MAPK- und Akt-Signalwege im Gehirn Shank3-defizienter Mäuse.

Sowohl Hippocampus- als auch Cortex-Lysate von Wildtyp (WT) und Shank3-defizienten Mäusen (*Knockout*, ko) wurden in einem Immunblot mit spezifischen Antikörpern für phospho-Erk, Erk (A), phospho-Akt und Akt (C) untersucht. Um die Aktivität des MAPK- und PI3K-Signalweges zu berechnen, wurde das Verhältnis von phospho-Erk/Erk (B) und phospho-Akt/Akt (D) kalkuliert.

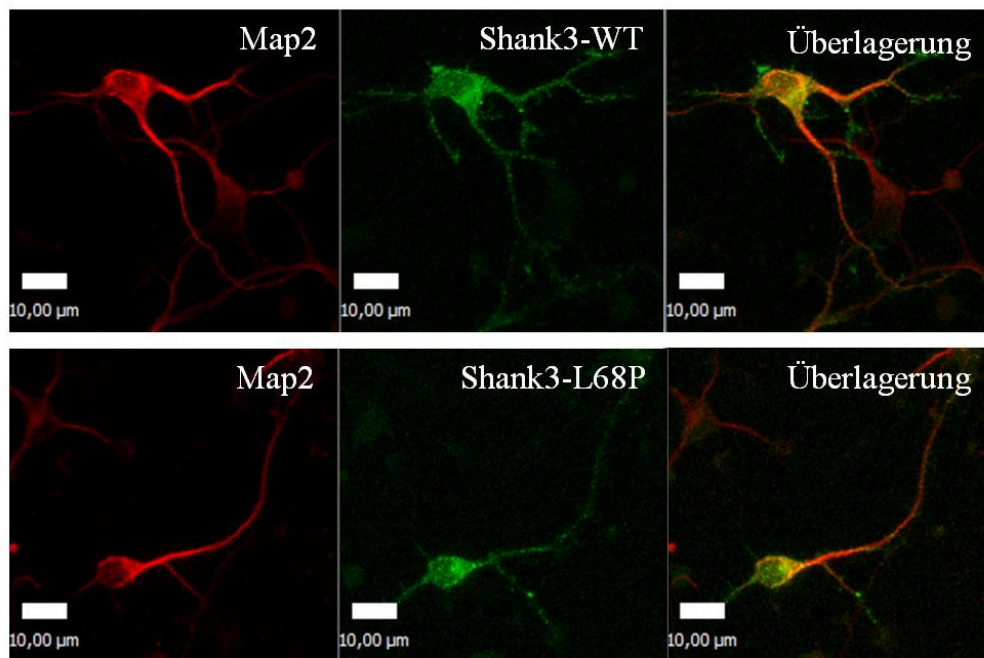
Die Analyse der Aktivität der MAPK- und PI3K-Signalwege von Shank3-Wildtyp und Shank3-defizienten Mäusen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden

Genotypen. Sowohl der MAPK- als auch der PI3K-Signalweg werden somit nicht durch den Verlust von Shank3 beeinträchtigt. Das Resultat des Immunblots widerlegt die auf *in vitro*-Daten basierende Hypothese, dass die Ras-vermittelten MAPK- und PI3K-Signalwege von Shank3 *in vivo* beeinflusst werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte darin bestehen, dass Shank1 den Funktionsverlust von Shank3 aufgrund der Shank1-Hochregulation in der postsynaptischen Dichte von Shank3-defizienten Mäusen kompensiert. Diese Hypothese wird unterstützt durch weitere *in vitro* Daten, die zeigen, dass auch die Shank1-Überexpression, aber nicht die Überexpression von Shank2, die MAPK-Aktivität in HEK293T-Zellen reduziert (unpublizierte Daten).

5.7 Identifizierung von Shank3 als Negativregulator des kleinen G-Proteins Rap

Interessanterweise berichtete unser Kooperationspartner Igor Barsukov (Liverpool, England), dass das Rap1-Protein in einer ITC- (isotherme Titrationskalometrie) Analyse eine etwa 10fach höhere Bindungsaffinität zu Shank3 aufwies als das Ras-Protein. Das Rap1-Protein gehört ebenfalls zur Familie der Ras-Proteine und ist dafür bekannt, dass es das Neuritenwachstum bei Neuronen reguliert. In Zusammenarbeit mit Fatemeh Hassani Nia fokussierten wir uns insbesondere auf das Integrin-abhängige Neuritenwachstum. Hierzu wurden Shank3-WT-GFP oder Shank3-L68P-GFP Konstrukte mittels Nukleofektion direkt nach der Präparation eingebracht und die Zellen wurden anschließend auf Laminin-beschichtete Platten ausgesät, da es sich bei Laminin um einen Integrin-Liganden handelt. Anschließend wurde sowohl die Länge der Neuriten als auch die Anzahl von dendritischen Endspitzen von Shank3-WT oder Shank3-L68P-exprimierenden Neuronen einen Tag nach Aussaat der Zellen bestimmt. Es wurden 7 unabhängige Experimente mikroskopisch durchgeführt und die Neuritenlänge wurde mittels Fiji-Software gemessen (siehe Abbildung 19).

A



B

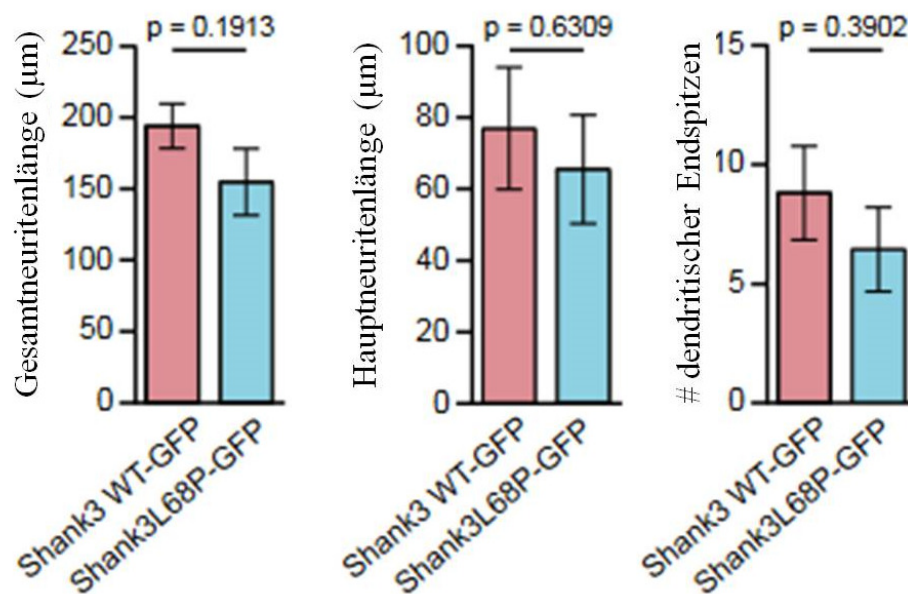


Abbildung 19 Untersuchung der Rap1-abhängigen Neuritenentwicklung in Shank3 WT oder L68P überexprimierenden corticalen Neuronen.

A Beispielhafte Bilder von Shank3-WT-GFP oder Shank3-L68P-GFP überexprimierenden corticalen Neuronen der Ratte, welche am Tag der Präparation mittels Nukleofektion transfiziert und einen Tag nach der Aussaat auf Laminin-beschichteten Platten fixiert wurden. Die Neuronen wurden mit einem MAP2-spezifischen Antikörper und dem sekundären Antikörper Alexa-633 angefärbt. B Die Graphen zeigen die Daten zur Gesamt-Neuritenlänge, mittleren Neuritenlänge und Anzahl dendritischer Endspitzen der Neuronen, Die Messung der Neuritenlänge erfolgte anhand der Map2-Färbung mittels Fiji-Software (Mittelwert +/- Standardfehler; n=7 unabhängige Experimente; statistische Analyse: Student's T-Test).

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die Überexpression der Shank3-L68P-Mutante im Vergleich zu Shank3-WT eine Verringerung der Neuritenlänge und eine Reduzierung der Anzahl dendritischer Endspitzen bewirkte. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant.

Des Weiteren wurde in Kooperation mit Johanna Ivaska's Arbeitsgruppe (Turku, Finland) die funktionelle Bedeutung der mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziierten Mutationen bei der Regulation der Integrinaktivierung untersucht. Es ist bekannt, dass das Rap1-Protein in seiner aktiven und GTP-gebunden Form in einem Komplex mit Riam und Talin die Aktivierung von Integrinen induziert. Johanna Ivaska's Arbeitsgruppe zeigte anhand von Untersuchungen von Tumorzellen, dass die Integrinaktivierung von Shank3 beeinflusst wird, während in dieser Arbeit Neuronen untersucht wurden. Es wurde zunächst eine durchflusszytometrische Messung von Neuronen adulter Shank3-WT- und Shank3-Knockout-Mäuse durchgeführt, bei der die Signalintensitäten von Gesamt-Integrin und aktiven Integrinen gemessen wurden. Hierfür wurden die hippocampalen Neuronen von Shank3-defizienten (*Knockout*, KO) oder Shank3-Wildtyp Mäusen mit den spezifischen Antikörpern für Gesamtintegrine (MAB1997) und aktive Integrine (9EG7) angefärbt. Das Verhältnis der Menge an aktiven Integrinen zu der Gesamtmenge an Integrinen gibt Aufschluss über das Maß der Integrinaktivierung von Shank3-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (siehe Abbildung 20).

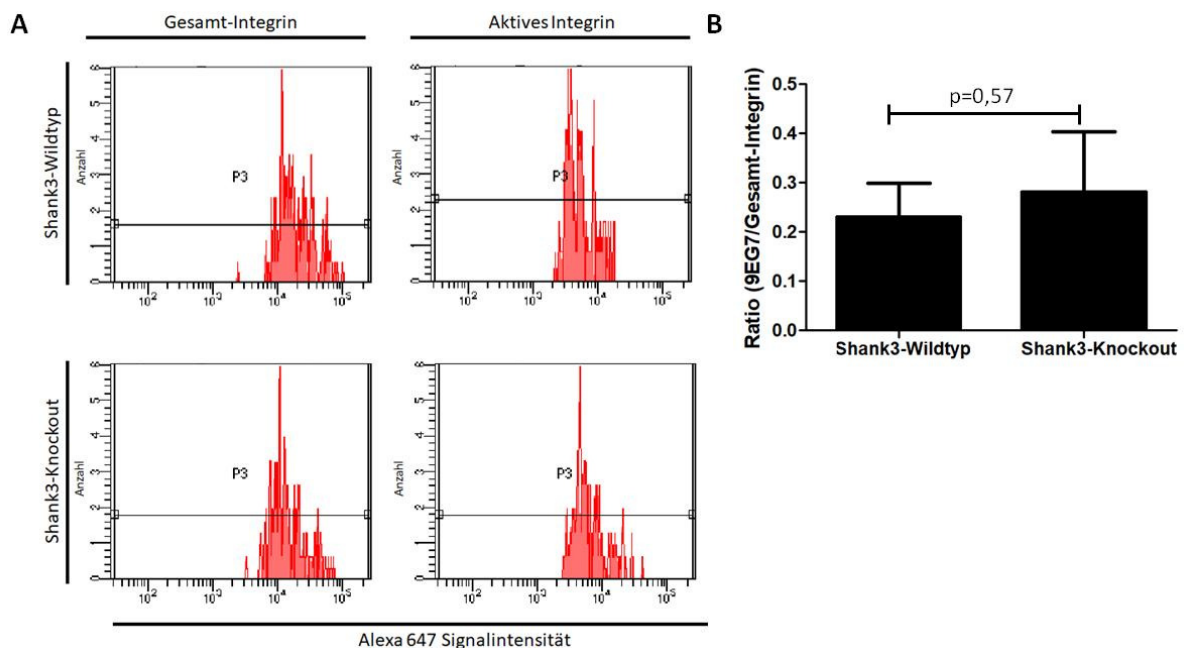


Abbildung 20 Durchflusszytometrische Bestimmung der Integrinaktivität bei adulten Shank3-defizienten und Shank3-Wildtyp Mäusen.

A Hippocampale Neuronen wurden mit spezifischen Antikörpern für Gesamtintegrine und aktive Integrine (9EG7) angefärbt. Als sekundärer Antikörper wurde jeweils Alexa Fluor 647-anti-rat eingesetzt. Beispielhaft sind hier die Histogramme von einer Shank3-Wildtyp- und einer Shank3-defizienten Maus gezeigt. Die Histogramme zeigen, wieviele Zellen eine bestimmte Alexa-647-Signalstärke aufwiesen. B Es wurde die mittlere Signalintensität von aktivem und Gesamt-Integrin bestimmt und die Integrinaktivität (aktiv/Gesamtintegrin) kalkuliert. Die Integrinaktivität ist leicht, jedoch nicht signifikant, erhöht bei Shank3-defizienten Mäusen (n=3 unabhängige Experimente; T-Test: $p=0,57$).

In der durchflusszytometrischen Analyse von adulten Shank3-defizienten Mäusen konnte nur eine leichte Erhöhung der Integrinaktivitätssignalstärke festgestellt werden; der Unterschied zu Shank3-Wildtyp-Mäusen war nicht signifikant. Die immunhistochemische Färbung von adulten Mäusen mit den spezifischen Antikörpern für Gesamtintegrine und aktive Integrine bestätigte, dass die Signalintensitäten sowohl bei Gesamtintegrinen als auch aktiven Integrinen nur sehr gering war (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Tatsache, dass $\beta 1$ -Integrine besonders wichtig für die neuronale Entwicklung des Cortex (Corticogenese) sind (Graus-porta et al. 2001), wurden weitere immunhistochemische Färbungen im frühen postnatalen Stadium P0,5 durchgeführt. Hier wurden wieder die Gehirne von Shank3 $\alpha\beta^{-/-}$ -Mäusen mit denen von WT-Mäusen (P0,5) verglichen. Hierbei wurde mittels spezifischer Antikörper sowohl Gesamt-Integrin als auch aktives Integrin angefärbt. Des Weiteren wurde auch der dendritische Marker Map2 angefärbt und die Zellkerne mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. In Abbildung 21 ist zunächst die immunhistochemische Färbung von Gesamt-Integrin, Map2 und DAPI dargestellt.

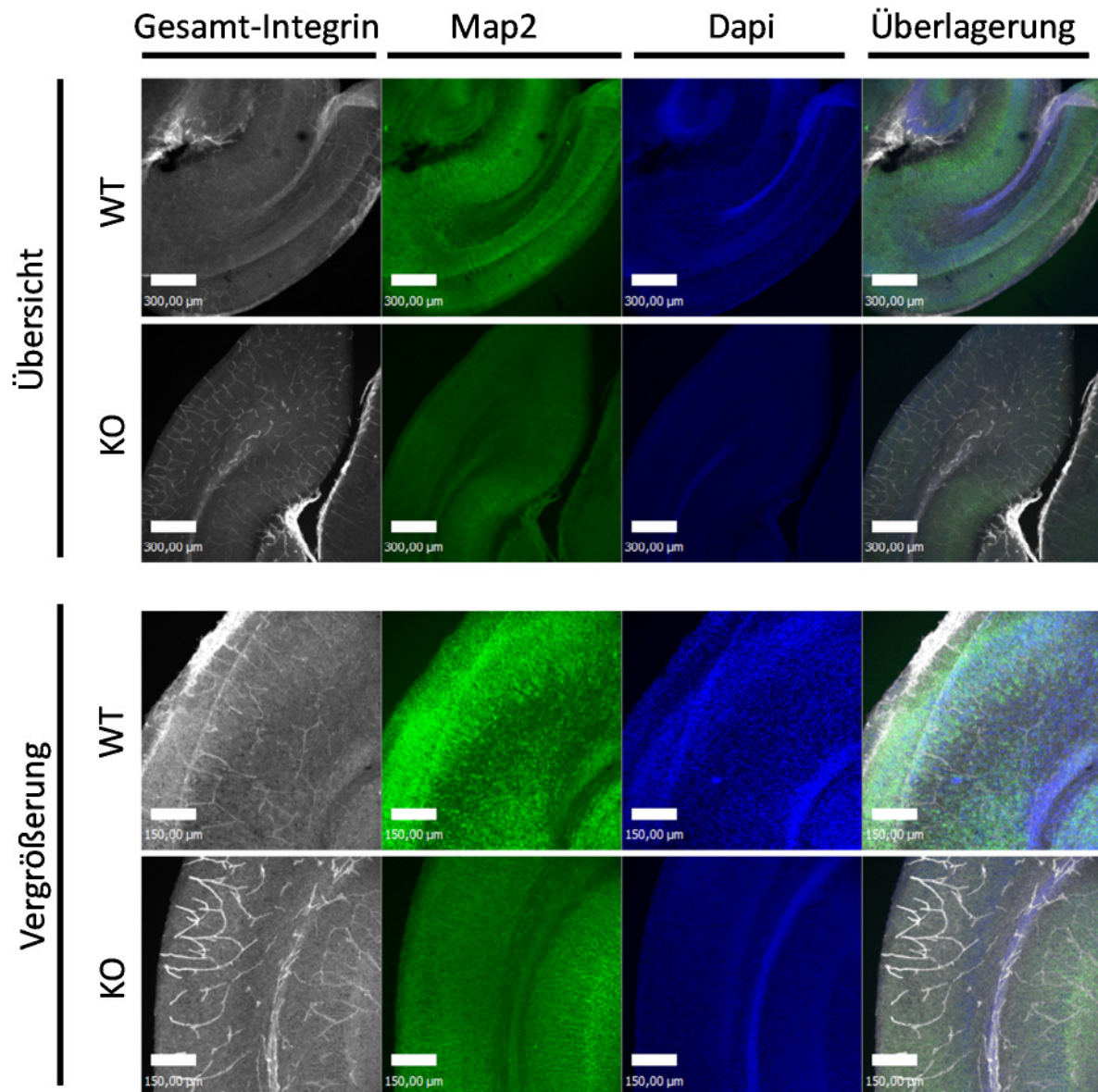


Abbildung 21 Immunhistochemische Färbung von Gesamt-Integrin bei Shank3-defizienten (KO) Mäusen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen.

Beispielhafte Bilder von immunzytochemischen Färbungen. Es wurden immer zwei P 0,5-Mäuse des jeweiligen Genotyps (WT oder KO) untersucht. Die coronalen Schnitte wurden mittels spezifischer Antikörper für Gesamt-Integrin (Alexa-568) und MAP2 (Alexa-488) angefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt.

Anhand der immunhistochemischen Daten von Gesamtintegrinen von Shank3-defizienten Mäusen ist zu sehen, dass bei den Präparaten von Shank3-Knockout-Tieren eine deutlichere Integrinfärbung erkennbar ist als bei den Wildtyp-Tieren. Abbildung 22 zeigt die immunhistochemische Färbung von aktivem Integrin, Map2 und DAPI.

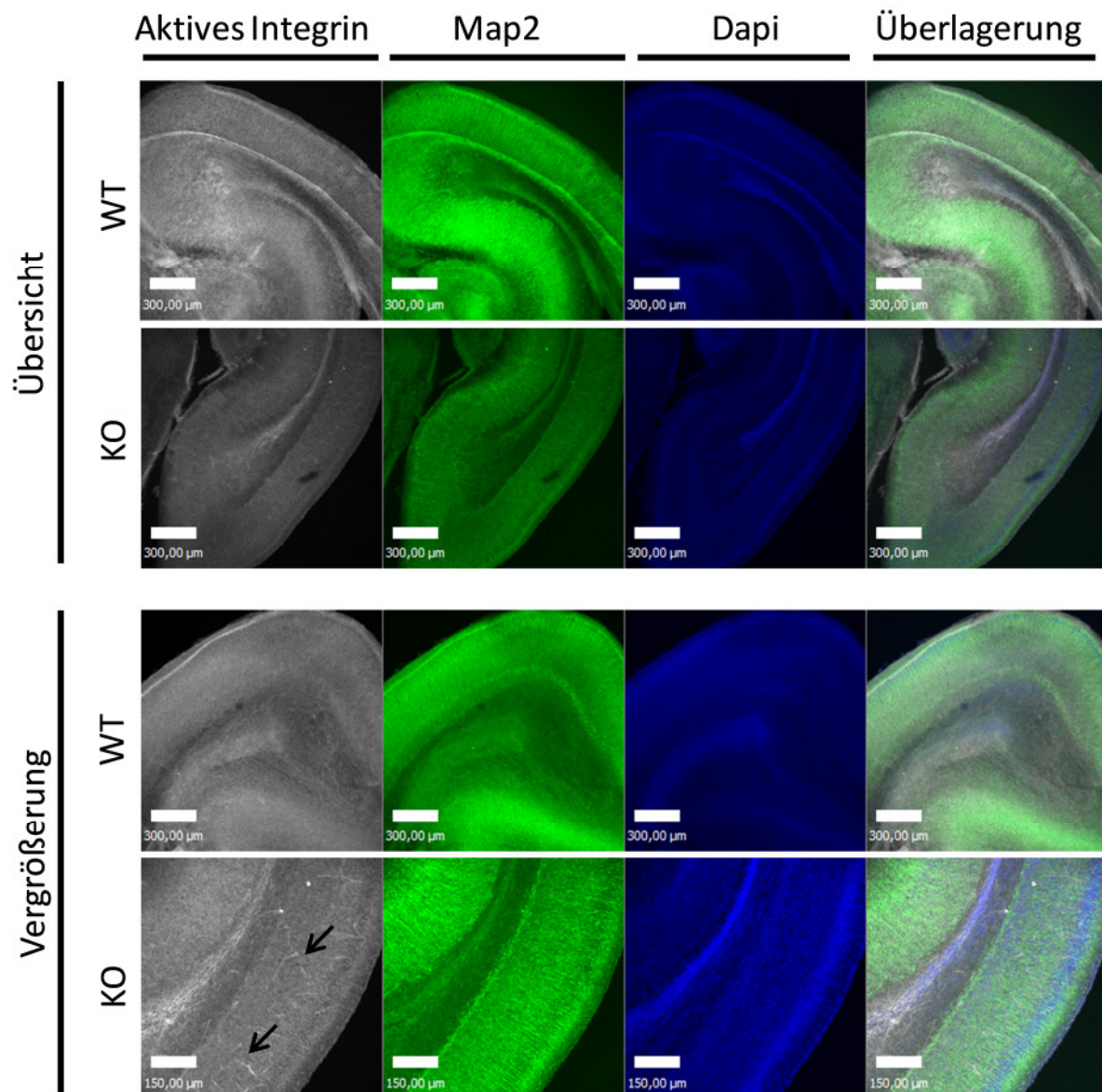


Abbildung 22 Immunhistochemische Färbung von aktivem Integrin bei Shank3-defizienten (KO) Mäusen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen.

Beispielhafte Bilder von immunzytochemischen Färbungen. Es wurden immer zwei P0,5-Mäuse des jeweiligen Genotyps (WT oder KO) untersucht. Die coronalen Schnitte wurden mittels spezifischer Antikörper für aktives Integrin (Alexa-568) und MAP2 (Alexa-488) angefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt.

Die immunhistochemische Analyse von aktiven Integrinen ergab, dass die Präparate Shank3-defizienter Mäuse ein etwas stärker ausgeprägtes Integrinmuster (in Abbildung 22 mit Pfeilen kenntlich gemacht) als bei den Shank3-Wildtyp-Mäusen aufwiesen. Somit lässt sich vermuten, dass durch den Verlust von Shank3 die Gesamtmenge von Integrinen und die Integrinaktivität gesteigert sind.

Die immunhistochemischen Daten ließen vermuten, dass die Abwesenheit des Shank3-Proteins einen Einfluss auf die Gesamtintegrinmenge und Integrinaktivität hat. Um dies nun

immunzytochemisch näher untersuchen zu können, wurden corticale Neuronen aus E16-Mausembryonen (aus einer Verpaarung von zwei *Knockout*-Tieren der *Shank3* $\alpha\beta^{-/-}$ -Linie) präpariert und eine Nukleofektion mit Shank3-WT-GFP oder Shank-L68P-GFP durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend auf Laminin und Ornithin-beschichteten Deckgläschen ausgesät. Einen Tag nach der Aussaat und Nukleofektion wurden die Zellen fixiert und bei der immunzytochemischen Analyse wurde aktives Integrin spezifisch angefärbt und in den Wachstumskegeln betrachtet (siehe Abbildung 23). Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Johanna Lilja und Johanna Ivaska (Turku, Finnland) durchgeführt und ausgewertet.

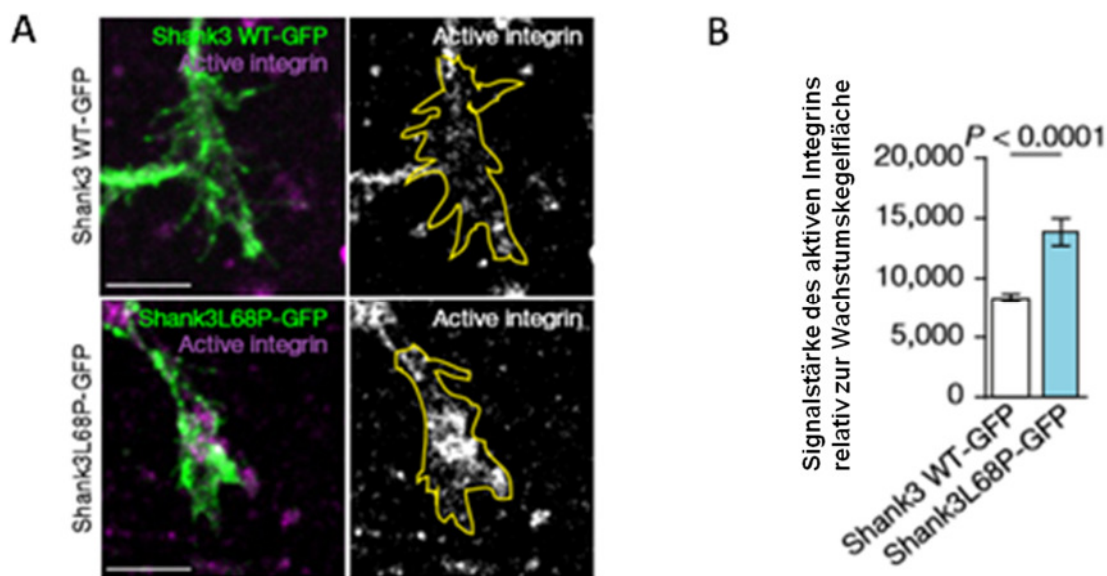


Abbildung 23 Untersuchung des Einflusses von Shank3 auf die Integrinaktivierung.

A *Shank3* $\alpha\beta^{-/-}$ corticale Neuronen wurden mit Shank3 WT-GFP- oder Shank3 L68P-GFP-Konstrukten transfiziert und auf Laminin ausplattiert. Die Zellen wurden einen Tag nach dem Ausplattieren fixiert und spezifisch mit einem Antikörper gegen aktives Integrin (9EG7) angefärbt. Gezeigt werden beispielhafte Bilder von neuronalen Wachstumskegeln. **B** Die Signalstärke aktiver Integrine wurde anhand der Intensität der Signale für aktives Integrin relativ zur Fläche berechnet (Mittelwert \pm Standardfehler; Student's T-Test: $p < 0,0001$, sehr hohe Signifikanz).

Die Überexpression von Shank3-WT reduzierte die Menge aktiver Integrine in Wachstumskegeln relativ zur Fläche im Vergleich zur Shank3-L68P-Mutante. Somit konnten die immunhistochemischen Daten bei der gezielten Analyse der Wachstumskegel von corticalen Mausneuronen bestätigt werden. Die schwächere Färbung aktiver Integrine ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Shank3-WT an GTP-gebundenes Rap bindet und dadurch den Rap-Integrin-Signalweg blockiert.

6 Diskussion

Synaptopathien sind neurologische Erkrankungen, die auf eine Fehlfunktion der Synapsen zurückzuführen sind (Grabrucker et al. 2011a). Bekannte Synaptopathien sind die Alzheimer'sche Erkrankung, Schizophrenie und Autismus-Spektrum-Störungen. Interessanterweise spielt das postsynaptisch lokalisierte Gerüstprotein Shank3 bei allen genannten Synaptopathien eine Rolle. Bei der Alzheimer'schen Erkrankung wurde ein gravierender Verlust von Shank3 festgestellt (Gong et al. 2009; Pham et al. 2010). Bei der Schizophrenie (Gauthier et al. 2010; Grabrucker et al. 2014) und den Autismus-Spektrum-Störungen wurden bei einigen Patienten *SHANK3*-Mutationen (Betancur & Buxbaum 2013; Bonaglia et al. 2001; Chen et al. 2014; Durand et al. 2007; Sebat et al. 2007; Wes et al. 2014) gefunden. Bisher wurde in zahlreichen Studien die Rolle von Shank3 als Gerüstprotein erforscht und untersucht, inwiefern sich der Verlust von Shank3 oder eine *SHANK3*-Mutation auf die Rekrutierung anderer Proteine an die Synapse, die synaptische Funktionalität und das Verhalten der betroffenen Organismen auswirkt. Zu Beginn meiner Doktorarbeit stand der Befund der Arbeitsgruppe Kreienkamp in Kooperation mit Igor Barsukov (Liverpool, England), dass Shank3 über die N-terminale SPN-Domäne auch mit kleinen GTPasen der Ras-Familie wie Ras und Rap interagiert, da es sich bei der SPN-Domäne um eine Ras-assoziierte (RA) Domäne handelt. Darauf aufbauend wurde ein Modell erstellt, das zeigt, wie Shank3 mit den kleinen Ras-GTPasen Ras und Rap interagieren könnte. Die Arbeitsgruppe Kreienkamp überprüfte weiterhin mittels Immunpräzipitationsexperimenten, ob Shank3 mit den kleinen Ras-GTPasen wie Ras und Rap interagiert und stellte fest, dass diese Bindung besonders stark bei den konstitutiv-aktiven Varianten der Ras-GTPasen ist (Lilja, J. et al. 2017). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde Shank3 in seiner neuen Rolle als Regulator kleiner G-Proteine untersucht. Der Fokus dieser Arbeit liegt hierbei auf der funktionellen Analyse der Interaktion zwischen Shank3 und kleinen G-Proteinen. Besonders interessant ist hierbei, dass die mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziierten und in der SPN-Domäne lokalisierten Mutationen L68P und R12C dazu führen, dass die Bindung zu Ras und Rap gestört wird. Dieser molekulare Defekt ermöglicht es, gezielt die Funktion der SPN-Domäne hinsichtlich der Bindung zu den kleinen Ras-GTPasen Ras und Rap sowie deren Bedeutung für Shank3 zu untersuchen.

6.1 Zellbiologischer Nachweis der Interaktion zwischen Shank3 und kleinen GTPasen

6.1.1 Subzelluläre Lokalisation und Interaktion von Shank3 und kleinen G-Proteinen

Um zu untersuchen, wo die Interaktion zwischen Shank3 und Ras-GTPasen von Bedeutung ist, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit zunächst die Lokalisation von Ras (am Beispiel von HRas) und Shank3 in hippocampalen Neuronen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl Shank3 als auch HRas in dendritischen Dornen angereichert vorliegen, wobei HRas eine breitere Verteilung zeigte (siehe Abbildung 7). Die verschiedenen Ras-Varianten sind an zahlreichen Signalwegen und Proteininteraktionen in der Zelle beteiligt (Fivaz & Meyer 2005; Hancock 2003; Pearson G et al. 2001; Thomas & Haganir 2004) und es ist daher zu erwarten, dass sie in Neuronen relativ weit verbreitet sind. Die Anreicherung des HRas-WT-Proteins an der Synapse deutet jedoch daraufhin, dass die Ras-vermittelten Signalwege an dieser Stelle besonders aktiv sind. Die subzelluläre Lokalisation von Ras und Rap in Neuronen wurde in früheren Studien (Srivastava et al. 2012) untersucht. Die breite Verteilung dieser beiden Proteine wurde von Srivastava et al. gezeigt und bestätigt sich durch diese Daten. Des Weiteren wurde anhand der Überexpression von Shank3-WT, Shank3-L68P und Shank3-R12C und der Färbung von endogenem Shank3-Protein festgestellt, dass alle untersuchten Proteine eine Lokalisation an der Synapse aufweisen und die Mutationen keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins haben (siehe Abbildung 6); dies bestätigte frühere Daten der Arbeitsgruppe (Mameza et al. 2013). Mameza et al. zeigten auch, dass sowohl die Dichte der dendritischen Dornen als auch das Verhältnis der Shank3-Proteinmenge zwischen dendritischem Schaft und dendritischen Dornen aufgrund der untersuchten Shank3-Mutationen L68P, R300C und Q321R nicht verändert wird. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass in den verwendeten Rattenneuronen zusätzlich zur überexprimierten Shank3-Variante auch das endogene Shank3-Wildtyp-Protein exprimiert wurde. Aufgrund der im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Kollokalisationsstudie konnte keine Aussage darüber gemacht werden, ob Shank3 und Ras dort wo sie kollokalisiert sind, auch miteinander interagieren. Daher wurde eine Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementationsanalyse (engl. *Bimolecular Fluorescence Complementation Analysis*, BiFC) durchgeführt, wie sie schon zuvor von Hu et al. und Kerppola et al. beschrieben wurde (Hu et al. 2002; Kerppola 2009). Bei dem durchgeführten Experiment wurden RFP-markiertes Shank3 mit dem N-terminalen Bereich des gelben Fluoreszenzprotein (engl. *Yellow fluorescent protein*, YFP) fusioniert und HA-markiertes Ras mit dem C-terminalen Bereich von YFP fusioniert. Beide Fusionsproteine wurden in HEK293T-Zellen exprimiert. Diese

Herangehensweise hat den Vorteil, dass sowohl die Expression der einzelnen Proteine anhand des RFP-Signals und mittels immunzytochemischer Anfärbung der HA-Proteine, als auch die Interaktion beider Proteine anhand des YFP-Signals nachgewiesen werden kann. Für die Interaktionsstudie wurden HEK293T-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und anschließend wurde bei doppelt-transfizierten HEK-Zellen das YFP-Signal mittels konfokaler Mikroskopie detektiert. Die Signalintensität des YFP ist ein Maßstab für die Interaktion zwischen Shank3 und HRas. Es wurde festgestellt, dass das Shank3-WT-Protein mit dem HRas-WT-Protein interagiert und diese Bindung bei der konstitutiv-aktiven Form HRas-G12V verstärkt vorliegt. In Kombination von Shank3 und der dominant-negativen HRas-S17N-Mutante wurde nur ein sehr schwaches YFP-Signal detektiert, welches vermutlich darauf beruht, dass die beiden Proteine sich in zufälliger Nähe zueinander befinden. Des Weiteren wurde bei den Shank3-L68P- und Shank3-R12C-Mutanten festgestellt, dass die Interaktion zu Shank3 stark reduziert ist (siehe Abbildung 8). Um die YFP-Signalintensität präzise und in einem großen Maßstab quantitativ analysieren zu können, wurden die transfizierten Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich der mittleren YFP-Signalintensität von lebenden RFP-positiven Zellen untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass die Menge der zu diesem Zeitpunkt interagierenden Shank3- und HRas-G12V-Proteine ungefähr doppelt so hoch ist im Vergleich zu Zellen, die Shank3- und HRas-WT exprimieren. Im Vergleich von Shank3-WT zu der Mutante Shank3-L68P in Koexpression mit Hras-G12V ist die Menge interagierender Proteine bei der Mutante um 49,2% reduziert. Im Vergleich zwischen Shank3-Wildtyp und Shank3-R12C liegt eine Reduktion interagierender Proteine von 35,4% vor. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Shank3- und HRas-Proteinen sind hoch signifikant (siehe Abbildung 9). Diese durchflusszytometrische Interaktionsanalyse wurde ebenfalls mit den Shank3-Konstrukten und einem Rap1-Konstrukt mit dem C-terminalen Bereich von YFP (Rap1-CY) durchgeführt. Auch hier konnte eine Reduzierung der Interaktion mit Rap1 bei den Shank3-Mutanten L68P und R12C um 39-55% festgestellt werden (siehe Abbildung 10). Diese Daten verifizieren die Resultate der proteinbiochemischen Immunpräzipitationsexperimente in Form einer zellbiologischen Analyse, die sowohl immunzytochemisch als auch durchflusszytometrisch durchgeführt wurde.

6.2 Funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen Shank3 und kleinen G-Proteinen

6.2.1 Etablierung von Systemen zur gezielten Aktivierung von Ras und Rap

Die Koexpression von Shank3 in Kombination mit Ras oder Rap führte häufig zu morphologischen Veränderungen oder zum Zelltod der Neuronen, so dass es mit nicht möglich war, den Effekt der Ras-Aktivierung auf Shank3 in Neuronen direkt zu untersuchen. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Überexpression von Shank3 und den kleinen Ras-GTPasen Signalwege beeinflusst, welche die Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Zelle regulieren. Es ist bekannt, dass sowohl Ras als auch Rap diese zellulären Prozesse regulieren (Hancock 2003). Weiterhin ist auch bekannt, dass es sich bei Ras um ein so genanntes Proto-Onkogen handelt, welches bei Tumoren in mutierter und konstitutiv-aktiver Form vorliegen kann und gravierend zum Tumorwachstum und zu morphologischen Veränderungen der Zelle beiträgt (Boespflug et al. 2017; Jinesh et al. 2017). Zusätzlich konnte auch in früheren Studien gezeigt werden, dass Störungen der Ras-vermittelten MAPK- und PI3K-AKT-mTOR-Signalwege Ursache für neuronale Entwicklungsstörungen wie beispielsweise das Noonan-Syndrom, das CFC-Syndrom, Autismus-Spektrum-Störungen, Fragiles X-Syndrom und Neurofibromatose sind (Borrie et al. 2017). Aufgrund der Robustheit von HEK-Zellen konnten die Interaktionsstudien in diesen Zellen durchgeführt werden; Neuronen sind allerdings sehr viel sensitiver und reagieren vermutlich viel stärker als HEK-Zellen auf drastische Änderungen von Signaltransduktionswegen. Um somit den Einfluss der Interaktion von Shank3 und den kleinen Ras-GTPasen Ras und Rap näher untersuchen zu können, wurden die zugehörigen Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) und Guaninnukleotid-aktivierenden Proteine (GAPs) als Zielstruktur zur gezielten Aktivierung der kleinen Ras-GTPasen Ras und Rap ausgenutzt. Als Zielstruktur zur gezielten Aktivierung der Ras-GTPasen an den Synapsen wurde SynGAP ausgewählt. Bei dem SynGAP-Protein handelt es sich um ein Ras-GTPase-aktivierendes Protein (Ras-GAP), welches in großer Menge an exzitatorischen Synapsen vorkommt (Duarte et al. 2011; Kim et al. 1998; Wang, Held & Hall 2013; Woolfrey et al. 2009). Durch die lentivirale Expression einer spezifisch gegen SynGAP-mRNA gerichteten shRNA in kortikalen Neuronen konnte die SynGAP-Expression effizient herunterreguliert werden (siehe Abbildung 11). Weiterhin wurde anhand des Verhältnisses der phospho-Erk zu Erk-Menge gezeigt, dass diese Manipulation zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung des Ras-vermittelten MAPK-Signalweges in Neuronen führt (siehe Abbildung 12). Basierend auf den Daten von Mameza et al., die proteinbiochemisch eine intramolekulare Bindung zwischen der SPN-Domäne von

Shank3 und der ARR-Domäne zeigen (Mameza et al. 2013) und dem Wissen, dass die kleinen Ras-GTPasen Ras und Rap an die SPN-Domäne binden (Lilja, J. et al. 2017), besteht die Hypothese, dass die Bindung von Ras zu einer Konformationsänderung von Shank3 führt, welche die Interaktion mit anderen Interaktionspartnern von Shank3 wie beispielsweise Fodrin zur Regulation des Aktinzytoskeletts beeinflusst. Um den Effekt einer Ras-aktivierten Konformationsänderung von Shank3 untersuchen zu können, bedeutet die Etablierung einer effizienten Herunterregulation der SynGAP-Proteinmenge, dass in weiteren Experimenten gezielt der Einfluss der Aktivierung von synaptisch-lokalisierten Ras-Proteinen auf die Funktion von Shank3 an Synapsen untersucht werden kann. Hierbei dienen die Shank3-Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C, welche eine Störung bei der Bindung zu Ras-GTPasen aufweisen, als Kontrolle, um gezielt Effekte nachweisen zu können, die auf der Interaktion zwischen Shank3-WT und aktivierten Ras-Proteinen zurückzuführen sind.

In einem weiteren Experiment wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine Methode zur gezielten Rap-Aktivierung eingesetzt. Hierzu wurde die Aktivität des postsynaptisch lokalisierten Guaninnukleotid-Austauschfaktors (engl. *Guanine nucleotide exchange factor*, GEF) Epac2 mit dem cAMP-Analogon 8-CPT stimuliert. Aufgrund der Interaktion zwischen Rap und Shank3 wurde die Hypothese aufgestellt, dass die vermehrte Aktivierung von Rap zur veränderten Anreicherung des Shank3-Proteins in der postsynaptischen Dichte führen könnte. Diese Hypothese wurde überprüft, in dem hippocampale Maus-Neuronen, die mit einem Shank3-WT-Konstrukt transfiziert worden waren, mit 8-CPT behandelt wurden und im Vergleich zu den unbehandelten Zellen die Shank3-Signalstärke sowohl im dendritischen Schaft als auch im dendritischen Dornen analysiert wurde. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Shank3-Signalstärke von dendritischem Schaft und dendritischen Dornen zwischen behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden und somit konnte kein Beweis für die Hypothese der Rekrutierung von Shank3 via Rap-Aktivierung festgestellt werden (siehe Abbildung 13). Ein großer Nachteil dieser Methode ist, dass bei den zu analysierenden hippocampalen Neuronen nicht festgestellt werden konnte, ob die 8-CPT-Behandlung tatsächlich zur Aktivitätssteigerung von Rap führte. Insofern ist der Knockdown des Neuronen-spezifischen SynGAP-Proteins, welches sowohl die Ras- als auch Rap-Aktivität steigert (Duarte et al. 2011), die bessere Methode zur gezielten Untersuchung der Effekte der beiden GTPasen auf Shank3.

6.2.2 Zellbiologischer Nachweis der intramolekularen Bindung zwischen SPN- und ARR-Domäne

In vorherigen Studien der Arbeitsgruppe Kreienkamp wurde proteinbiochemisch festgestellt, dass die SPN-Domäne intramolekular mit der ARR-Domäne interagiert und dass diese Bindung durch die L68P-Mutation (nicht aber durch die R12C Mutation) zerstört wird (Mameza et al. 2013). Die intramolekulare Bindung zwischen SPN- und ARR-Domäne wurde in der dreidimensionalen Struktur des N-terminalen Bereichs von Shank3 bestätigt und die potentiell beteiligten Aminosäuren, welche polare Bindungen eingehen, konnten identifiziert werden (Lilja, J. et al. 2017). Interessanterweise wurde von Arons et al. ein Modell erstellt, bei der sich die Konformation von Shank3 in Abhängigkeit von der Zinkkonzentration verändert und synaptisch lokalisiertes Shank3 in einem Signalkomplex mit Neuroligin und AMPA-Rezeptoren in einer aktiven, offenen Konformation vorliegt (Arons et al. 2016). Aufgrund der bisherigen Daten wurde die Hypothese aufgestellt, dass Shank3 in Abhängigkeit von seiner Lokalisation und der Bindung zu kleinen G-Proteinen eine offene, aktive Konformation an der Synapse aufweist, während Shank3 außerhalb der Synapsen in einer geschlossenen, inaktiven Konformation vorliegt. Im Rahmen dieser Hypothese wird vermutet, dass die Konformationsänderung durch die Bindung von kleinen G-Proteinen wie Ras induziert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde in dieser Arbeit die Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Methode, wie sie von Jeyifous et al. beschrieben wurde, zur Analyse der Shank3-Konformation in HEK293T-Zellen eingesetzt (Jeyifous et al. 2016). In dieser Arbeit wurden Shank3-WT, Shank3-L68P und Shank3-R12C-Konstrukte mit den codierenden Sequenzen für SPN- und ARR-Domäne eingesetzt, welche am N-Terminus die kodierende Sequenz für GFP und am C-Terminus die kodierende Sequenz für mCherry aufwiesen. Bei einer Faltung des Shank3-Proteins durch die intramolekulare Bindung zwischen SPN- und ARR-Domänen, verstärkt sich das FRET-Signal, da die beiden Fluoreszenzproteine GFP und mCherry sich näher beieinander befinden und die GFP-Emission effizient mCherry anregen kann. Die lebendzellmikroskopischen Aufnahmen während einer 20-minütigen EGF-Stimulation, welche zur Aktivierungssteigerung des koexprimierten HRas-WT führt, zeigten, dass sich die Lokalisation des FRET-Signals bei Expression von Shank3-WT während dieser Zeit verändert; die beiden Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C zeigen allerdings eine geringere FRET-Signalintensität und keine Veränderungen der FRET-Signal-Lokalisation nach EGF-Stimulation (siehe Abbildung 15). Dies lässt vermuten, dass durch die Stimulation mit EGF das HRas-Protein aktiviert wird, an die SPN-Domäne des Shank3-Proteins bindet, die geschlossene Shank3-Konformation

hierdurch geöffnet wird und sich die Shank3-Proteine anschließend wieder zu Aggregaten neu formieren. Das durchflusszytometrische Experiment bestätigte, dass die FRET-Signalstärke, welche ein Maß für die intramolekulare Bindung zwischen SPN- und ARR-Domäne ist, von Shank3-WT wesentlich höher ist als bei der Shank3-L68P-Mutante und die FRET-Signalstärke bei der Shank3-R12C-Mutante leicht reduziert vorliegt. Mit der durchflusszytometrischen FRET-Analyse ließ sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen EGF-stimulierten und unstimulierten Zellen in Abhängigkeit von der Koexpression von Hras-WT nachweisen. Mittels Lebendzellmikroskopie konnte hingegen gezeigt werden, dass eine subzelluläre Umsortierung des FRET-Signals stattfindet, die in durchflusszytometrischen Analysen nicht detektiert werden kann (siehe Abbildung 16). Hinzuzufügen ist allerdings, dass die verwendeten Konstrukte eine nukleäre Lokalisations-Sequenz (NLS) beinhalten, so dass die Shank3-Fusionsproteine im Zellkern lokalisiert sind. Obwohl Shank3-Varianten durchaus schon im Zellkern beobachtet wurden, ist die Bedeutung dieser NLS-Sequenz unklar. Für eine weitere Untersuchung ist es wichtig, die nukleäre Sequenz zu entfernen, da diese aufgrund der nukleären Lokalisation von Shank3 den Kontakt zwischen Shank3 und Hras vermutlich behindert. In zukünftigen Experimenten sollen die etablierten Methoden zur Analyse der intramolekularen Bindung eingesetzt werden, um in hippocampalen Neuronen zu untersuchen, in welcher Konformation Shank3-WT und die Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C an der Synapse vorliegen, und zu analysieren, ob die intramolekulare Bindung mittels Aktivierung von kleinen G-Proteinen beeinflusst werden kann.

6.2.3 Einfluss der Shank3-Expression auf Rekrutierung von Ras-Proteinen an die Synapse und auf Ras-vermittelte Signalwege

Das Gerüstprotein Shank3 interagiert mit zahlreichen postsynaptischen Proteinen und ist wesentlich für die Struktur und Funktionalität der Synapse verantwortlich. Um die Frage zu beantworten, wie sich die Zusammensetzung der postsynaptischen Dichte bei einem Verlust von Shank3 verändert, untersuchten Schmeisser et al. die synaptosomale Fraktion der Shank3 $\alpha\beta^{-/-}$ defizienten Maus. Hierbei stellten sie fest, dass Shank2 und Shank1 bei Verlust von Shank3 in größerer Menge vorkommen und so vermutlich zum Teil für den Verlust von Shank3 kompensieren. Die GluN2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors und die GluA1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors liegen dagegen in geringerer Menge vor. Interessanterweise konnten keine Veränderungen hinsichtlich der bekannten Interaktionspartner GKAP und PSD95 festgestellt werden (Schmeisser et al. 2012). Im

Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund der neuen Erkenntnisse zur Interaktion zwischen Shank3 und Ras-Proteinen untersucht, ob die Ras-Proteine von Shank3 an die Synapse rekrutiert werden. Hierfür wurde die Menge von Ras-Proteinen, die in der postsynaptischen Dichte vorkommen, bei Shank3 $\alpha\beta^{-/-}$ defizienten Mäusen im Vergleich zu Shank3-Wildtyp-Mäusen bestimmt. Die Daten zeigen, dass Shank3-defiziente Mäuse eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion der Menge an Ras-Proteinen in der postsynaptischen Dichte aufweisen (siehe Abbildung 17). Möglicherweise wird der Verlust von Shank3 durch die erhöhte Menge von Shank1 in einem gewissen Maße kompensiert. Die SPN-Domäne, welche den Kontakt zu Ras-GTPasen vermittelt, kommt nämlich nicht nur in dem Shank3-Protein vor, sondern auch bei Shank1. Die im Vorderhirn exprimierten Varianten von Shank2 enthalten dagegen keine SPN-Domäne (Mameza et al. 2013). Tatsächlich konnte die Arbeitsgruppe Kreienkamp in unpublizierten Experimenten feststellen, dass nicht nur Shank3, sondern auch Shank1 die Aktivierung des MAP Kinase Signalweges durch HRas in HEK293T-Zellen hemmen können, während dies bei Shank2 nicht der Fall ist. Somit interagiert also auch Shank1 über die SPN-Domäne mit Ras und hat einen negativ-regulierenden Effekt auf die MAPK-Aktivität in einem zellulären System.

Der verwendete Ras-Antikörper erkennt sowohl HRas als auch NRas und KRas. Das Shank3-Protein bindet alle drei Ras-Isoformen; allerdings könnte es sein, dass nicht alle Ras-Isoformen gleichermaßen von einem Verlust von Shank3 hinsichtlich der Lokalisierung innerhalb der postsynaptischen Dichte beeinflusst werden. Aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen Ras-Isoformen konnte dies nicht näher untersucht werden.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob die durch Ras vermittelten MAPK- und PI3K-Signalwege durch den Verlust von Shank3 beeinflusst werden. Aufgrund der oben bereits erwähnten Ergebnisse, die zeigen, dass Shank3-WT die durch HRas induzierte MAPK-Signalaktivität in HEK293T-Zellen signifikant reduziert (unpublizierte Daten), wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Verlust von Shank3 *in vivo* zu einer Steigerung der MAPK-Signalaktivität führen würde. Es konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede der MAPK- oder PI3K-Signalaktivität zwischen Wildtyp- und Shank3-defizienten Mäusen festgestellt werden (siehe Abbildung 18). Dies könnte ebenfalls darauf hindeuten, dass die in Shank3-defizienten Mäusen erhöhte Menge an Shank1-Proteinen in der postsynaptischen Dichte diesbezüglich die Funktion von Shank3 übernimmt. Diese Vermutung wurde kürzlich von Sala et al. bestätigt, indem eine Shank1/Shank3-doppelte-Knockout-Maus (Shank1/3 DKO Maus) generiert und der Phosphorylierungsstatus von Akt und Erk1/2 analysiert wurde.

Es wurde gezeigt, dass bei der Shank1/3 DKO-Maus im Vergleich zur WT-Maus eine reduzierte Phosphorylierung von Akt und Erk1/2 vorliegt und daraus wurde geschlussfolgert, dass der Verlust von Shank1 und Shank3 zu einer funktionellen Reduktion der MAPK- und PI3K-Aktivität führt. Diese Beobachtung widerspricht allerdings der auf den *in vitro* Daten basierenden Hypothese, dass eine Expression von Shank3 die MAPK-Aktivität reduziert und somit Shank3 als Negativ-Regulator des MAPK-Signalweges fungiert. Basierend auf den *in vivo* Daten scheint es daher vielmehr so zu sein, dass die Menge von Ras-Proteinen in der postsynaptischen Dichte aufgrund des Verlustes von Shank3 reduziert ist und daher die MAPK-Aktivität reduziert ist. Weiterhin wurde von Sala et al. auch eine reduzierte Phosphorylierung hinsichtlich eEF2, S6 und Arc festgestellt. Interessanterweise liegt auch eine Reduktion der postsynaptisch lokalisierten mGlu5- und Homer-Proteine vor. In den Verhaltensanalysen konnte zusätzlich festgestellt werden, dass starke Störungen bei den kognitiven Eigenschaften der Mäuse, dem Sozialverhalten und der Motorik vorliegen und die Mäuse ein auffälliges repetitives Verhalten zeigen. Die meisten Tiere versterben im Alter von P22-25 (Posterpräsentation von Sala et al., Neuroscience conference 2017, Washington, USA). Um die Hypothese zu überprüfen, ob die Rekrutierung von Ras-Proteinen an die Synapse durch den gleichzeitigen Verlust von Shank1 und Shank3 gestört wird, wäre es sinnvoll die Menge an Ras-Proteinen in der postsynaptischen Dichte von Shank1/3 doppelten-*Knockout*-Mäusen zu bestimmen.

6.3 Identifizierung von Shank3 als Negativregulator für die Integrinaktivierung mittels direkter Bindung an Rap1

Die Arbeitsgruppe Kreienkamp wies in vorherigen Experimenten nach, dass Shank3 nicht nur HRas, KRas und NRas bindet, sondern auch Rap1a und Rap1b in seinen konstitutiv-aktiven Varianten besonders effizient bindet (Lilja, J. et al. 2017). Hinzu kommt, dass unser Kooperationspartner Igor Barsukov mittels isothermer Titrationskalorimetrie feststellte, dass Rap1-GTP eine zehnfach höhere Bindungsaffinität zu Shank3-SPN (WT)-ARR aufweist als HRas-GTP. Des Weiteren ist bekannt, dass aktives Rap1 in einem Komplex mit Talin und Riam Integrin aktivieren kann. Interessanterweise konnte unsere Kooperationspartnerin Johanna Ivaska in zell-basierten Versuchen nachweisen, dass Shank3 die Integrinaktivität inhibiert und dadurch die Ausbreitung von Tumorzellen, die Zellmigration und die Ausbildung von Adhäsionskontakten negativ reguliert (Lilja, J. et al. 2017). Aufgrund der Bedeutung von Shank3 bei der Entstehung von Synaptopathien und der Tatsache, dass die mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziierten Mutationen Shank3-L68P und Shank3-R12C eine

Bindung zu Rap1-GTP stören, wurde die funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen Shank3 und Rap hinsichtlich Integrin-vermittelter Effekte untersucht. Es ist bekannt, dass die Integrinaktivität das Neuritenwachstum erhöht (Tucker, Rahimtula & Mearow 2005). Daher wurde vermutet, dass Shank3 aufgrund der Bindung zu Rap-GTP das Neuritenwachstum hemmen würde. Es wurde allerdings festgestellt, dass die Dendritenlänge und die Anzahl von dendritischen Endspitzen bei Überexpression von Shank3-WT im Vergleich zur Überexpression mit Shank3-L68P in hippocampalen Rattenneuronen zwar leicht, aber nicht signifikant erhöht ist (siehe Abbildung 19). Der Grund für diese leichte Erhöhung des Dendritenwachstums könnte sein, dass Shank3-WT Rap-GTP blockiert und die nicht von Shank3 beeinträchtigten Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 das vermehrte Neuritenwachstum induzieren. Das Neuritenwachstum wird komplex sowohl von der Ras-GTPase Rap als auch durch RhoGTPasen reguliert. Im Gegensatz zu den Ras-GTPasen binden die beiden Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 nicht an die SPN Domäne von Shank3 (Lilja, J. et al. 2017). Es ist bekannt, dass die beiden Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 die Elongation von Neuriten induzieren, in dem das Aktinzytoskelett reorganisiert wird (Aoki et al. 2005); während die Aktivität der Rho GTPase RhoA die Neuritenlänge reduziert (Maldonado et al. 2017). Des Weiteren ist auch bekannt, dass Rap1 die Aktivität des RhoGAP ARAP3, induzieren kann und dies zur Phosphorylierung und Inaktivierung von RhoA führt (Jeon et al. 2012). Hinzu kommt, dass Cullere et al. nachwies, dass die RhoA-Aktivität bei Aktivierung des Epac/Rap1-Signalweges mittels 8-CPT-Behandlung gehemmt wird (Cullere et al. 2004), was ebenfalls auf einen Crosstalk beider Signalwege schließen lässt. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass eine Blockierung von Rap-GTP durch die Bindung an Shank3- zu einer erhöhten Aktivität der Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 führt, wodurch die Phosphorylierung und somit Inaktivierung von RhoA verhindert wird, während dies bei der Überexpression der Shank3-Mutante L68P nicht der Fall ist.

In einem weiteren Experiment wurde immunhistochemisch untersucht, ob bei Shank3-defizienten Mäusen eine Veränderung der Integrinaktivität im Cortex vorliegt. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse in zwei Publikationen von Shah et al., die zeigen, dass konditionale Rap1-Knockout-Mäuse und C3G/RapGEF1-Knockout-Mäuse im Embryonalstadium eine dramatische Reduktion von Gesamtintegrin und aktivem Integrin zeigen (Shah et al. 2016, 2017), wurde angenommen, dass die Shank3-defizienten Mäuse wegen der negativ-regulierenden Wirkung von Shank3 auf Rap-GTP einen Anstieg der Menge von Gesamtintegrinen und aktiven Integrinen zeigen würde. Diese Hypothese wurde mittels der immunhistochemischen Färbung von Gesamtintegrinen und aktiven Integrinen von Shank3-

WT- und Shank3-defizienten Mäusen im frühen Entwicklungsstadium P0,5 bestätigt (siehe Abbildung 21). Weiterhin konnte mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, dass auch bei adulten Shank3-defizienten Mäusen eine geringe, jedoch nicht signifikante Erhöhung der Integrinaktivität vorliegt (siehe Abbildung 20). Aufgrund der Tatsache, dass die Aktivität der Integrine während der neuronalen Entwicklung besonders stark ist, ist es nicht verwunderlich, dass man bei den adulten Tieren mit einer geringeren Integrinaktivität keinen signifikanten Effekt feststellen kann. Um anschließend gezielt den Funktionsverlust des Shank3-Proteins bei Vorliegen der mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziierten Shank3-L68P-Mutation in Hinblick auf die Integrinaktivität untersuchen zu können, wurden Shank3-WT- oder Shank3-L68P-Proteine in Shank3-defizienten Mausneuronen (E16) überexprimiert und einen Tag nach der Aussaat für aktive Integrine gefärbt. Es konnte festgestellt werden, dass die Shank3-L68P-überexprimierenden Zellen eine höhere Signalstärke für aktive Integrine in den Wachstumskegeln kortikaler Neuronen im Vergleich zu Shank3-WT aufwiesen (siehe Abbildung 23). Eine mögliche Erklärung ist, dass Shank3 als Negativregulator von Rap fungiert, in dem Shank3 aktives, GTP-gebundenes Rap bindet und somit die Aktivierung von Integrienen verhindert. Basierend auf diesen Daten wurde ein Modell erstellt, bei dem Shank3 mittels SPN-Domäne an das aktive GTP-gebundene Rap1 bindet und auf diese Art und Weise verhindert, dass Rap1 in einem Komplex mit RIAM und Talin Integrine aktiviert (siehe Abbildung 24).

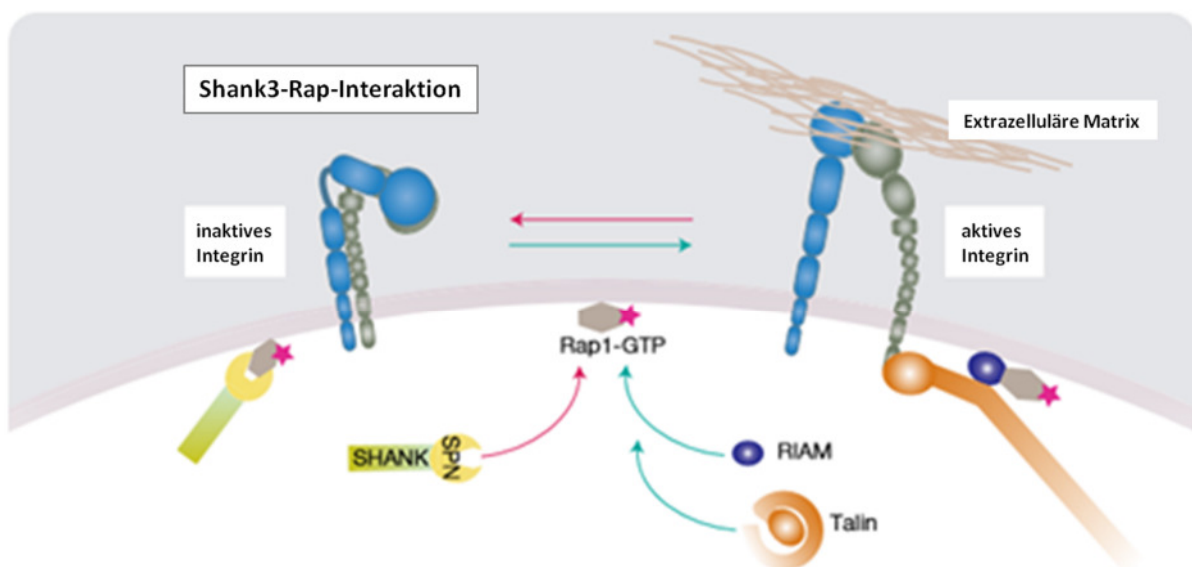


Abbildung 24 Schematische Darstellung der Rolle von Shank3 als Negativ-Regulator der Integrinaktivierung

Das Modell zeigt, wie Shank3 über die SPN-Domäne aktiviertes GTP-gebundenes Rap binden kann und dadurch die Interaktion von Rap-GTP mit RIAM und Talin verhindert, so dass Integrine nicht aktiviert werden können. (modifizierte Abbildung nach Lilja et al. 2017).

6.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde Shank3 als Negativregulator der Ras-GTPase Rap im zentralen Nervensystem identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Shank3 und GTP-gebundenem aktivem Rap die Aktivierung von Integrinen inhibiert und diese Funktion des Proteins bei Vorhandensein der mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziierten Mutation Shank3-L68P oder bei Verlust von Shank3 gestört ist. In weiteren Experimenten gilt es herauszufinden, ob Shank3 ebenfalls ein Effektorprotein von Ras-GTPasen ist. Basierend auf den von Mameza et al. publizierten Daten (Mameza et al. 2013) und der in dieser Doktorarbeit durchgeführten Konformationsanalyse von Shank3 ist zu vermuten, dass die Bindung von Ras-GTPasen die Konformation von Shank3 verändert, so dass die Bindung anderer Shank3-Interaktionspartner, wie z.B. der Liganden der Shank3-ARR-Domäne, verändert ist. Im Rahmen dieser neuen Hypothese wird angenommen, dass die Shank3 L68P-Mutante aufgrund des Funktionsverlustes bezüglich der intramolekularen Bindung zwischen SPN- und ARR-Domäne stets in einer offenen Konformation mit uneingeschränktem Zugang für ARR-Liganden vorliegt, während die Faltung des Shank3-WT-Proteins durch Ras-GTPasen stark reguliert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte zunächst mit den im Rahmen dieser Doktorarbeit etablierten Methoden zur FRET-Analyse untersucht werden, welche Konformation Shank3-WT lokalisationsabhängig in hippokampalen Neuronen aufweist und ob die Konformation von Shank3 sich nach Ras-GTPase-Aktivierung öffnet. Weiterhin sollten die synaptisch lokalisierten Ras-GTPasen Ras und Rap spezifisch durch die im Rahmen dieser Doktorarbeit etablierte Methode der Herunterregulation der SynGAP-Proteinmenge (*SynGAP-Knockdown*) aktiviert werden und sowohl die Morphologie der dendritischen Dornen als auch die Funktionalität der Synapse untersucht werden, in dem Shank3-WT und Shank3-L68P-überexprimierende Zellen verglichen werden. Diese Daten sollten durch weitere strukturelle Untersuchungen des Shank3-Ras/Rap-Komplexes, die von unserem Kooperationspartner Igor Barsukov durchgeführt werden, unterstützt werden. Weiterhin ist bisher bekannt, dass Shank3 indirekt auch einen Einfluss auf das Aktinzytoskelett hat und der Shank3-ARR-Ligand α -Fodrin eine Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts spielt. In weiteren Untersuchungen könnte durch Herunterregulation von α -Fodrin herausgefunden werden, ob der in der Literatur beschriebene regulierende Effekt von Fodrin auf die Stabilität des Aktinzytoskeletts Shank3-abhängig ist. Hierbei wird angenommen, dass die Shank3-L68P-Mutante aufgrund der offenen Konformation einen konstitutiv aktiven Effekt auf einen bisher unbekanntem Ras-GTPase-Shank3-Signalweg hat, der das Aktinzytoskelett reguliert. Weiterhin wäre es von großem

Vorteil mit einer Shank1-Shank3-Doppel-*Knockout*-Mauslinie zu arbeiten, um zu erforschen, inwiefern die SPN-Domäne von Shank1 die Funktion der Shank3-SPN-Domäne in Bezug auf Ras-GTPasen übernehmen kann und weitere Signalwege, welche von der SPN-Ras-GTPase-Interaktion beeinflusst werden, zu identifizieren. Die ersten veröffentlichten Ergebnisse dieser Mauslinie zeigen, dass die Aktivität der Ras-vermittelten MAPK- und PI3K-Signalwege durch den Verlust von Shank1 und Shank3 herunterreguliert ist. Dies ist vermutlich darin zu begründen, dass durch den Verlust von Shank1 und Shank3 weniger Ras-Proteine via SPN-Domäne an die Synapse rekrutiert werden. Hierzu sollte eine Analyse der Ras-Proteinmenge in der postsynaptischen Dichte durchgeführt werden. Weiterhin sollte bei diesen Mäusen auch die Integrinaktivität immunzytochemisch und immunhistochemisch untersucht werden. Basierend auf den Daten der Shank3-defizienten Maus ist anzunehmen, dass der negativ-regulatorische Effekt von Shank3 hinsichtlich der Integrinaktivierung in einer Shank1-Shank3-Knockout-Maus, die keine Shank-SPN-Domäne besitzt, noch stärker erkennbar ist.

7 Zusammenfassung/Summary

7.1 Zusammenfassung

Synaptopathien sind Erkrankungen des Nervensystems, die auf eine Fehlfunktion der Synapsen zurückzuführen sind. Zu diesen Erkrankungen gehören die Alzheimer'sche Erkrankung, Schizophrenie und Autismus-Spektrum-Störungen. Bisher war das Shank3-Protein vor allem als Strukturprotein in der postsynaptischen Dichte bekannt, welches durch zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen eine Vielzahl von Proteinen innerhalb der postsynaptischen Dichte vernetzt und die funktionelle Stabilität der Synapse gewährleistet.

Dieser Arbeit lag die Beobachtung zugrunde, dass es sich darüber hinaus bei der Shank3-SPN-Domäne um eine Ras-assoziierte Domäne handelt, die an Ras-GTPasen bindet. Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass diese Interaktion durch die mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziierten Mutationen L68P und R12C gestört wird. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen Shank3 und Ras-GTPasen aufzuklären und ein besseres Verständnis für die Bedeutung und Funktionalität des N-terminalen Bereichs von Shank3 zu erhalten. Hierbei wurden insbesondere die beiden Ras-GTPasen Ras und Rap untersucht. Bei der Analyse der Interaktion zwischen Shank3 und Ras-GTPasen wurde zunächst festgestellt, dass Shank3- und HRas-Proteine in den dendritischen Dornen angereichert sind, das HRas-Protein jedoch eine breitere Verteilung in der neuronalen Zelle zeigt. Zur spezifischen zellbiologischen Untersuchung der Interaktion von Shank3 und Ras-GTPasen wurde eine bimolekulare Fluoreszenz-Analyse durchgeführt. Es konnte zellbiologisch gezeigt werden, dass sowohl Ras als auch Rap eine Interaktion zu Shank3 eingehen, die konstitutiv aktive HRas-G12V-Mutante eine stärkere Bindung als HRas-WT aufweist und die beiden Shank3-Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C eine Störung bei der Bindung zu Ras-GTPasen zeigen. Weiterhin wurde zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Interaktion von Shank3 und Ras-GTPasen ein effizienter SynGAP-Knockdown-Virus etabliert, der die Proteinmenge an SynGAP drastisch reduziert und in Folge einer Aktivitätssteigerung von Ras in der Synapse zu einer erhöhten Aktivität des MAPK-Signalweges führt. Der generierte Vektor ermöglicht zukünftige Experimente zur Untersuchung von Shank3 als Effektorprotein von Ras-GTPasen. Weiterhin wurde durch Behandlung mit 8-CPT das Rap-GEF Epac2 spezifisch aktiviert und festgestellt, dass dies nicht zu einer Rekrutierung von Shank3 an die Synapse führt. Durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Shank3-SPN-Domäne eine intramolekulare Bindung mit der ARR-Domäne eingeht und diese Bindung bei den

beiden Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C gestört ist. Eine Stimulation der Ras-Aktivität mittels EGF-Behandlung zeigte bei Shank3-WT, aber nicht bei Shank3-L68P und Shank3-R12C-überexprimierenden HEK293T-Zellen in der Lebendzellmikroskopie eine kurzfristige Änderung der Lokalisation von Shank3-Aggregaten. In der Durchflusszytometrie konnte allerdings keine Veränderung der Intensität des FRET-Gesamtsignals im Hinblick auf unterschiedliche Ras-Aktivitäten festgestellt werden; dies lässt vermuten, dass die Shank3-Proteine nach Stimulation durch Ras in ihrer Konformation geöffnet werden und sich unmittelbar danach in einer anderen Konstellation in Shank3-Aggregaten zusammenlagern.

Sowohl die Ras-Proteinmenge in der postsynaptischen Dichte, als auch die Aktivität Ras-vermittelter Signalwege sind im Gehirn Shank3-defizienter Mäuse nicht verändert. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das Shank1-Protein, welches ebenfalls eine SPN-Domäne besitzt, den Funktionsverlust von Shank3 in hohem Maße kompensieren kann.

Bei der Untersuchung des Neuritenwachstums wurden ebenfalls keine signifikanten Veränderungen bei Überexpression des Shank3-L68P-Proteins festgestellt. Es wurden allerdings erhebliche Unterschiede in der Rap-vermittelten Integrinaktivität festgestellt. So wurde immunhistochemisch gezeigt, dass der Verlust des Shank3-Proteins im frühen pränatalen Entwicklungsstadium (P0,5) zu einer Erhöhung der Menge an Gesamt-Integrinen und aktiven Integrinen führt, während dieser Effekt bei adulten Tieren kaum nachweisbar ist. Bei einer Analyse hippocampaler Neuronen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Integrinaktivität bei Shank3-WT überexprimierenden Zellen in den Wachstumskegeln geringer als bei Shank3-L68P überexprimierenden Zellen ist. Somit konnte in dieser Arbeit das Shank3-Protein als Negativ-Regulator der Ras-GTPase Rap identifiziert werden, welcher die Integrinaktivierung durch Bindung an aktives, GTP-gebundenes Rap verhindert.

8.2 Summary

Synaptopathies are neurological disorders which are caused by functional defects of the synapse. These synaptic disorders include Alzheimer's disease, schizophrenia and autism spectrum disorders.

Previous studies have shown that Shank3 is a scaffolding protein at the postsynaptic density which interacts with several proteins within the postsynaptic density and functionally stabilizes the synapse.

This work is based on the observation that the Shank3-SPN domain is a Ras association domain which binds Ras GTPases; the interaction between Shank3 and Ras GTPases is strongly affected by the mutations causing Shank3-L68P and Shank3-R12C mutants, which were found in patients with autism spectrum disorders.

This work aimed to clarify the function of the interaction between Shank3 and Ras GTPases and to investigate the functional role of the N-terminal part of Shank3. Therefore, the focus was on the Ras GTPases Ras and Rap.

To start the analysis of the interaction between Shank3 and Ras GTPases, it was shown via immunocytochemistry that Shank3 and HRas are both localized at the dendritic spines with HRas being more broadly distributed in hippocampal neurons. To specifically analyze the binding between Shank3 and Ras GTPases a bimolecular fluorescence analysis was performed. It was shown in cell-based fluorescence assay that Ras as well as Rap interact with Shank3, that the constitutively active form HRas-G12V binds stronger to Shank3 when compared to HRas-WT and that the mutants Shank3-L68P or Shank3-R12C show impaired binding to Ras GTPases. Furthermore, an efficient SynGAP knockdown virus was established which activates the MAPK signaling pathway via Ras activation. In future experiments this virus can be used to investigate, if Shank3 is an effector protein of Ras GTPases. Additionally, hippocampal neurons were treated with 8-CPT, which specifically activates the Rap GEF Epac2. The localization of Shank3 was not altered at the synapse after Rap activation.

Via Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) analysis it was shown that Shank3-SPN domain binds intramolecularly to the ARR domain and that this binding is impaired in Shank3-L68P or Shank3-R12C mutants. The stimulation of Ras activity via EGF treatment led to changes in the appearance of Shank3-WT, but not Shank3-L68P and Shank3-R12C aggregates within HEK293T cells during live cell imaging. The measurement of the total

FRET signal intensity via flow cytometry did not change after treatment. One possible explanation is that the Shank3 conformation opens up after Ras activation and Shank3 proteins form new aggregates immediately thereafter.

The analysis of the Ras protein level and Ras-mediated signaling pathways in Shank3 deficient mice, which have a higher Shank1 protein level compared to wildtype mice, showed no significant differences in Ras protein level within the postsynaptic density or the activity of MAPK and PI3K pathways. These results indicate that the SPN domain-containing Shank1 protein could in parts compensate the functional loss of Shank3.

Upon analysis of neurite growth, I also did observe significant differences in Shank3-L68P overexpressing neurons compared to wildtype.

However, the analysis of Rap-mediated integrin activation showed drastical changes due to the loss of the Shank3-SPN domain functionality. Via immunohistochemistry it was shown that Shank3 deficient mice (P0,5) have a higher level of total integrin and active integrin in cortical brain tissue during early postnatal development - whereas this can be barely detected in adult mice. Further analysis of Shank3-L68P overexpressing neurons show higher integrin activity compared to Shank3-WT in hippocampal neurons. Thus, Shank3 was identified as negative regulator of Ras-GTPase Rap by binding to active GTP-bound Rap protein and inhibiting integrin activity.

9 Sicherheit und Entsorgung

Alle Versuche wurden in Laboren der Sicherheitsstufe 1 und 2 durchgeführt. Der Umgang mit Chemikalien erfolgte unter Beachtung der jeweiligen Sicherheitsdatenblätter. Alle Chemikalien, Lösungen und Puffer sowie Komponenten der Versuchstiere wurden entsprechend der Entsorgungsrichtlinien des UKE entsorgt.

Literaturverzeichnis

Alié, A & Manuel, M 2010, 'The backbone of the post-synaptic density originated in a unicellular ancestor of choanoflagellates and metazoans', *BMC Evolutionary Biology*, vol. 10, p. 34.

Aoki, K, Nakamura, T, Fujikawa, K & Matsuda, M 2005, 'Local Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate Accumulation Recruits Vav2 and Vav3 to activate Rac1/Cdc42 and Initiate Neurite Outgrowth in Nerve Growth Factor-stimulated PC12 cells', *Molecular biology of the cell*, vol. 16, no. 1, pp. 2207–2217.

Araki, Y, Zeng, M, Zhang, M & Huganir, R 2016, 'Rapid Dispersion of SynGAP from Synaptic Spines Triggers AMPA Receptor Insertion and Spine Enlargement during LTP', *HHS Public Access*, vol. 3, no. 10, pp. 973–982.

Arjonen, A, Alanko, J, Veltel, S & Ivaska, J 2012, 'Distinct Recycling of Active and Inactive β 1 Integrins', *Traffic*, vol. 13, no. 4, pp. 610–625.

Arons, MH, Lee, XK, Thynne, CJ, Kim, XSA, Schob, C, Kindler, S, Montgomery, XJM & Garner, CC 2016, 'Shank3 Is Part of a Zinc-Sensitive Signaling System That Regulates Excitatory Synaptic Strength', vol. 36, no. 35, pp. 9124–9134.

Arons, MH, Thynne, CJ, Grabrucker, a. M, Li, D, Schoen, M, Cheyne, JE, Boeckers, TM, Montgomery, JM & Garner, CC 2012, 'Autism-Associated Mutations in ProSAP2/Shank3 Impair Synaptic Transmission and Neurexin-Neuroigin-Mediated Transsynaptic Signaling', *Journal of Neuroscience*, vol. 32, no. 43, pp. 14966–14978.

Baron, MK, Boeckers, TM, Vaida, B, Faham, S, Gingery, M, Sawaya, MR, Salyer, D, Gundelfinger, ED & Bowie, JU 2006, 'An Architectural Framework That May Lie at the Core of the Postsynaptic Density', *Science*, vol. 311, pp. 531–536.

Bear, MF, Connors, BW & Paradiso, MA 2016, *Neuroscience - exploring the brain, 4th edition*.

Bekris, LM, Yu, C-E, Bird, TD & Tsuang, DW 2014, 'Genetics of Alzheimer disease', *American Journal of Neuroradiology*, vol. 35, no. 3, pp. 457–458.

Betancur, C & Buxbaum, JD 2013, 'SHANK3 haploinsufficiency: a “ common ” but underdiagnosed highly penetrant monogenic cause of autism spectrum disorders', *Molecular Autism*, vol. 4, Molecular Autism, no. 1, p. 1.

- Bird, TD 2009, 'Genetic Aspects of Alzheimer Disease', *Health Care*, vol. 10, no. 4, pp. 231–239.
- Böckers, TM, Germaine, M, Kreutz, MR, Weise, C, Buck, F, Richter, D & Gundelfinger, ED 2001, 'Synaptic Scaffolding Proteins in Rat Brain', *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 43, pp. 40104–40112.
- Bockmann, J, Kreutz, MR, Gundelfinger, ED & Bockers, TM 2002, 'ProSAP/Shank postsynaptic density proteins interact with insulin receptor tyrosine kinase substrate IRSp53', *J Neurochem*, vol. 83, no. 4, pp. 1013–1017.
- Boeckers, TM 2006, 'The postsynaptic density', *Cell and Tissue Research*, vol. 326, no. 2, pp. 409–422.
- Boeckers, TM, Bockmann, J, Kreutz, MR & Gundelfinger, ED 2002, 'ProSAP/Shank proteins - A family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease', *Journal of Neurochemistry*, vol. 81, no. 5, pp. 903–910.
- Boeckers, TM, Winter, C, Smalla, K-H, Kreutz, MR, Bockmann, J, Seidenbecher, C, Garner, CC & Gundelfinger, ED 1999, 'Proline-Rich Synapse-Associated Proteins ProSAP1 and ProSAP2 Interact with Synaptic Proteins of the SAPAP/GKAP Family', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 264, no. 1, pp. 247–252.
- Boespflug, A, Caramel, J, Dalle, S & Thomas, L 2017, 'Treatment of NRAS -mutated advanced or metastatic melanoma : rationale , current trials and evidence to date', pp. 481–492.
- Bonaglia, MC, Giorda, R, Borgatti, R, Felisari, G, Gagliardi, C, Selicorni, A & Zuffardi, O 2001, 'Disruption of the ProSAP2 gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 deletion syndrome.', *American journal of human genetics*, vol. 69, no. 2, pp. 261–268.
- Borrie, SC, Brems, H, Legius, E & Bagni, C 2017, 'Cognitive Dysfunctions in Intellectual Disabilities : The Contributions of the Ras-MAPK and PI3K-AKT-mTOR Pathways'.
- Bos, JL 2005, 'Linking Rap to cell adhesion', *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 17, no. 2, pp. 123–128.
- Bozdagi, O, Sakurai, T, Papapetrou, D, Wang, X, Dickstein, DL, Takahashi, N, Kajiwara, Y, Yang, M, Katz, AM, Scattoni, ML, Harris, MJ, Saxena, R, Silverman, JL, Crawley, JN, Zhou,

- Q, Hof, PR & Buxbaum, JD 2010, 'Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication.', *Molecular autism*, vol. 1, BioMed Central Ltd, no. 1, p. 15.
- Brandstätter, JH, Dick, O & Boeckers, TM 2004, 'The postsynaptic scaffold proteins ProSAP1/Shank2 and Homer1 are associated with glutamate receptor complexes at rat retinal synapses', *Journal of Comparative Neurology*, vol. 475, no. 4, pp. 551–563.
- Brickell, KL, Steinbart, EJ, Rumbaugh, M, Payami, H, Schellenberg, GD, Van Deerlin, V, Yuan, W & Bird, TD 2006, 'Early-Onset Alzheimer Disease in Families With Late-Onset Alzheimer Disease', *Archives of Neurology*, vol. 63, no. 9, p. 1307.
- Brondino, N, Fusar-poli, L, Rocchetti, M, Provenzani, U, Barale, F & Politi, P 2015, 'Complementary and Alternative Therapies for Autism Spectrum Disorder', vol. 2015, Hindawi Publishing Corporation.
- Bush, AI, Pettingell, WH, Paradis, MD & Tanzi, RE 1994, 'Modulation of A β adhesiveness and secretase site cleavage by zinc', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 16, pp. 12152–12158.
- Campion, D, Dumanchin, C, Hannequin, D, Dubois, B, Belliard, S, Puel, M, Thomas-Anterion, C, Michon, A, Martin, C, Charbonnier, F, Raux, G, Camuzat, A, Penet, C, Mesnage, V, Martinez, M, Clerget-Darpoux, F, Brice, A & Frebourg, T 1999, 'Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum.', *American journal of human genetics*, vol. 65, no. 3, pp. 664–70.
- Carmena, A, Makarova, A & Speicher, S 2011, 'The Rap1-Rgl-Ral signaling network regulates neuroblast cortical polarity and spindle orientation', *Journal of Cell Biology*, vol. 195, no. 4, pp. 553–562.
- Castellano, E & Downward, J 2011, 'RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway', *Genes & Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 261–274.
- Chai, CK 2007, 'The genetics of Alzheimer ' s disease', *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*, vol. 22, no. 1, pp. 37–41.
- Chen, J, Yu, S, Fu, Y & Li, X 2014, 'Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 8, no. September, pp. 1–13.
- Chigaev, A, Sklar, LA & Vorup-jensen, T 2012, 'Integrin and Cell Adhesion Molecules',

Methods Mol. Biol., vol. 757, no. 1, pp. 3–14.

Chiu, VK, Bivona, T, Hach, A, Sajous, JB, Silletti, J, Wiener, H, Johnson, RL, Cox, AD & Philips, MR 2002, 'Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi', *Nature Cell Biology*, vol. 4, no. May, pp. 343–350.

Coba, MP, Pocklington, AJ, Collins, MO, Kopanitsa, M V, Uren, RT, Swamy, S, Croning, MDR, Choudhary, JS, Seth, GN & Grant, SGN 2009, 'Neurotransmitters drive combinatorial multistate postsynaptic density networks.', *Science signaling*, vol. 2, no. 68, p. ra19.

Cochoy, DM, Kolevzon, A, Kajiwara, Y, Schoen, M, Pascual-Lucas, M, Lurie, S, Buxbaum, JD, Boeckers, TM & Schmeisser, MJ 2015, 'Phenotypic and functional analysis of SHANK3 stop mutations identified in individuals with ASD and/or ID', *Molecular Autism*, vol. 6, *Molecular Autism*, no. 1, pp. 1–13.

Condra, JA, Neibergs, H, Wei, W & Brennan, MD 2007, 'Evidence for two schizophrenia susceptibility genes on chromosome 22q13.', *Psychiatric Genetics*, vol. 17, no. 5, pp. 292–298.

Cristo, GD 2001, 'Requirement of ERK Activation for Visual Cortical Plasticity', *Science*, vol. 292, no. 5525, pp. 2337–2340.

Cullere, X, Shaw, SK, Andersson, L, Hirahashi, J, Lusinskas, FW & Mayadas, TN 2004, 'Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP activated exchange factor for Rap GTPase', *Blood*, vol. 105, no. 5, pp. 1950–1956.

Daw, EW, Payami, H, Nemens, EJ, Nochlin, D, Bird, TD, Schellenberg, GD & Wijsman, EM 2000, 'The number of trait loci in late-onset Alzheimer disease.', *American journal of human genetics*, vol. 66, no. 1, pp. 196–204.

DeKosky, ST, Aston, CE & Kamboh, AI 1996, 'Polygenic Determinants of Alzheimer's Disease: Modulation of the Risk by α -1-Antichymotrypsin', *Annals of the New York Academy of Sciences*, no. 412, pp. 27–34.

DeLisi, LE, Shaw, SH, Crow, TJ, Shields, G, Smith, AB, Larach, VW, Wellman, N, Loftus, J, Nanthakumar, B, Razi, K, Stewart, J, Comazzi, M, Vita, A, Heffner, T & Sherrington, R 2002, 'A genome-wide scan for linkage to chromosomal regions in 382 sibling pairs with schizophrenia or schizoaffective disorder', *American Journal of Psychiatry*, vol. 159, no. 5, pp. 803–812.

Du, Y, Weed, SA, Xiong, W, Marshall, TD & Parsons, JT 1998, 'Identification of a Novel Cortactin SH3 Domain-Binding Protein and Its Localization to Growth Cones of Cultured Neurons', *Molecular and Cellular Biology*, vol. 18, no. 10, pp. 5838–5851.

Duarte, DB, Duan, J-H, Nicol, GD, Vasko, MR & Hingtgen, CM 2011, 'Reduced expression of SynGAP, a neuronal GTPase-activating protein, enhances capsaicin-induced peripheral sensitization', *Journal of Neurophysiology*, vol. 106, no. 1, pp. 309–318.

Duffney, LJ, Zhong, P, Wei, J, Matas, E, Cheng, J, Qin, L, Ma, K, Dietz, DM, Kajiwara, Y, Buxbaum, JD & Yan, Z 2015, 'Autism-like Deficits in Shank3-Deficient Mice Are Rescued by Targeting Actin Regulators', *Cell Reports*, The Authors, pp. 1–14.

Durand, CM, Betancur, C, Boeckers, TM, Bockmann, J, Chaste, P, Fauchereau, F, Nygren, G, Rastam, M, Gillberg, IC, Anckarsa, H, Delorme, R, Chabane, N, Mas, P De, Bieth, E, Roge, B & Bourgeron, T 2007, 'Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders.', *Nature genetics*, vol. 39, no. 1, pp. 25–27.

Durand, CM, Perroy, J, Loll, F, Perrais, D, Fagni, L, Bourgeron, T, Montcouquiol, M & Sans, N 2012, 'SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism', *Molecular Psychiatry*, vol. 17, Nature Publishing Group, no. 1, pp. 71–84.

Fivaz, M & Meyer, T 2005, 'Reversible intracellular translocation of KRas but not HRas in hippocampal neurons regulated by Ca²⁺/calmodulin', *Journal of Cell Biology*, vol. 170, no. 3, pp. 429–441.

Garner, CC, Nash, J & Haganir, RL 2000, 'PDZ domains in synapse assembly and signalling', *Trends in Cell Biology*, vol. 10, no. 7, pp. 274–280.

Gauthier, J, Champagne, N, Lafrenière, RG, Xiong, L, Spiegelman, D, Brustein, E, Lapointe, M, Peng, H, Côté, M, Noreau, A, Hamdan, FF, Addington, AM, Rapoport, JL, DeLisi, LE, Krebs, M-O, Joobar, R, Fathalli, F, Mouaffak, F, Haghghi, AP, Néri, C, Dubé, M-P, Samuels, ME, Marineau, C, Stone, EA, Awadalla, P, Barker, PA, Carbonetto, S, Drapeau, P & Rouleau, GA 2010, 'De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 in patients ascertained for schizophrenia', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 17, pp. 7863–7868.

Gauthier, J, Spiegelman, D, Piton, A, Lafrenière, RG, Laurent, S, St-Onge, J, Lapointe, L,

- Hamdan, FF, Cossette, P, Mottron, L, Fombonne, ?ric, Joover, R, Marineau, C, Drapeau, P & Rouleau, GA 2009, 'Novel de novo SHANK3 mutation in autistic patients', *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, vol. 150, no. 3, pp. 421–424.
- Gerlach, B, Cordier, SM, Schmukle, AC, Emmerich, CH, Rieser, E, Haas, TL, Webb, AI, Rickard, JA, Anderton, H, Wong, WW, Nachbur, U, Gangoda, L, Warnken, U, Purcell, AW, Silke, J & Walczak, H 2011, 'Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling', *Nature*, vol. 471, no. 7340, pp. 591–596.
- Gillberg, C & Billstedt, E 2000, 'Autism and Asperger syndrome: coexistence with other clinical disorders', *Acta Psychiatrica Scandinavica*, vol. 102, no. 5, pp. 321–330.
- Gloerich, M & Bos, JL 2010, 'Epac: Defining a New Mechanism for cAMP Action', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 50, no. 1, pp. 355–375.
- Gong, Y, Lippa, CF, Zhu, J, Lin, Q & Rosso, AL 2009, 'Disruption of glutamate receptors at Shank-postsynaptic platform in Alzheimer's disease', *Brain Research*, vol. 1292, Elsevier B.V., pp. 191–198.
- Grabrucker, AM, Schmeisser, MJ, Schoen, M & Boeckers, TM 2011a, 'Postsynaptic ProSAP/Shank scaffolds in the cross-hair of synaptopathies.', *Trends in cell biology*, vol. 21, Elsevier Ltd, no. 10, pp. 594–603.
- Grabrucker, AM, Schmeisser, MJ, Udvardi, PT, Arons, M, Schoen, M, Woodling, NS, Andreasson, KI, Hof, PR, Buxbaum, JD, Garner, CC & Boeckers, TM 2011b, 'Amyloid beta protein-induced zinc sequestration leads to synaptic loss via dysregulation of the ProSAP2/Shank3 scaffold.', *Molecular neurodegeneration*, vol. 6, p. 65.
- Grabrucker, S, Proepper, C, Mangus, K, Eckert, M, Chhabra, R, Schmeisser, MJ, Boeckers, TM & Grabrucker, AM 2014, 'The PSD protein ProSAP2/Shank3 displays synapto-nuclear shuttling which is deregulated in a schizophrenia-associated mutation', *Experimental Neurology*, vol. 253, Elsevier Inc., pp. 126–137.
- Graus-porta, D, Blaess, S, Senften, M, Littlewood-evans, A, Damsky, C, Huang, Z, Orban, P, Schittny, JC, Mu, U & Francisco, S 2001, ' β 1-Class Integrins Regulate the Development of Laminae and Folia in the Cerebral and Cerebellar Cortex', *Neuron*, vol. 31, pp. 367–379.
- Greenwood, TA, Light, GA, Swerdlow, NR, Radant, AD & Braff, DL 2012, 'Association analysis of 94 candidate genes and schizophrenia-related endophenotypes', *PLoS ONE*, vol. 7,

no. 1.

Guez-Barber, D, Fanous, S, Harvey, BK, Zhang, Y, Lehrmann, E, Becker, KG, Picciotto, MR & Hope, BT 2013, 'FACS purification of immunolabeled cell types from adult rat brain', *J Neurosci Methods*, vol. 203, no. 1, pp. 10–18.

Halbedl, S, Schoen, M, Feiler, MS, Boeckers, TM & Schmeisser, MJ 2016, 'Shank3 is localized in axons and presynaptic specializations of developing hippocampal neurons and involved in the modulation of NMDA receptor levels at axon terminals', *Journal of Neurochemistry*, vol. 137, no. 1, pp. 26–32.

Hancock, JF 2003, 'Ras proteins: different signals from different locations', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 4, no. 5, pp. 373–385.

Hering, H & Sheng, M 2003, 'Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis', *J Neurosci*, vol. 23, no. 37, pp. 11759–11769.

Hu, C, Chinenov, Y, Kerppola, TK, Hughes, H & Arbor, A 2002, 'Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation', *Molecular Cell*, vol. 9, pp. 789–798.

Huang, YY, Martin, KC & Kandel, ER 2000, 'Both protein kinase A and mitogen-activated protein kinase are required in the amygdala for the macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 20, no. 17, pp. 6317–6325.

Hung, AY, Futai, K, Sala, C, Valtschanoff, JG, Ryu, J, Mollie, A, Kidd, FL, Sung, CC, Miyakawa, T, Bear, MF, Weinberg, J & Sheng, M 2009, 'Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1', *NIH Public Access*, vol. 28, no. 7, pp. 1697–1708.

Ikeda, F, Deribe, YL, Skanland, SS, Stieglitz, B, Grabbe, C, Franz-Wachtel, M, van Wijk, SJJ, Goswami, P, Nagy, V, Terzic, J, Tokunaga, F, Androulidaki, A, Nagawa, T, Pasparakis, M, Iwai, K, Sundberg, JP, Schaefer, L, Rittinger, K, Macek, B & Dikic, I 2012, 'SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NFκB activity and apoptosis', *Nature*, vol. 471, no. 7340, pp. 637–641.

Inoue, S, Imamura, A, Okazaki, Y, Yokota, H, Arai, M, Hayashi, N, Furakawa, A, Itokawa, M & Oishi, M 2007, 'Synaptotagmin XI as a candidate gene for susceptibility to schizophrenia', *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*,

vol. 144, no. 3, pp. 332–340.

Jan, HH, Chen, IT, Tsai, YY & Chang, YC 2002, ‘Structural role of zinc ions bound to postsynaptic densities’, *Journal of Neurochemistry*, vol. 83, no. 3, pp. 525–534.

Jeon, CY, Moon, MY, Kim, JH, Kim, HJ, Kim, JG, Li, Y, Jin, JK, Kim, PH, Kim, HC, Meier, KE, Kim, YS & Park, JB 2012, ‘Control of neurite outgrowth by RhoA inactivation’, *Journal of Neurochemistry*, vol. 120, no. 5, pp. 684–698.

Jeyifous, O, Lin, EI, Chen, X, Antinone, SE, Mastro, R & Drisdell, R 2016, ‘Palmitoylation regulates glutamate receptor distributions in postsynaptic densities through control of PSD95 conformation and orientation’, *PNAS*, vol. 113, no. 52, pp. 8482–8491.

Jiang, YH & Ehlers, MD 2013, ‘Modeling Autism by SHANK Gene Mutations in Mice’, *Neuron*, vol. 78, Elsevier Inc., no. 1, pp. 8–27.

Jinesh, GG, Sambandam, V, Vijayaraghavan, S, Balaji, K & Mukherjee, S 2017, ‘Molecular genetics and cellular events of K-Ras-driven tumorigenesis’, Nature Publishing Group, no. August, pp. 1–8.

Juan, WS, Lin, HW, Chen, YH, Chen, HY, Hung, YC, Tai, SH, Huang, SY, Chen, TY & Lee, EJ 2012, ‘Optimal Percoll concentration facilitates flow cytometric analysis for annexin V/propidium iodine-stained ischemic brain tissues’, *Cytometry Part A*, vol. 81 A, no. 5, pp. 400–408.

Karayiorgou, M, Morris, M a, Morrow, B, Shprintzen, RJ, Goldberg, R, Borrow, J, Gos, a, Nestadt, G, Wolyniec, PS & Lasseter, VK 1995, ‘Schizophrenia susceptibility associated with interstitial deletions of chromosome 22q11.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 17, pp. 7612–7616.

Kelleher, RJ, Geigenmüller, U, Hovhannisyan, H, Trautman, E, Pinard, R, Rathmell, B, Carpenter, R & Margulies, D 2012, ‘High-throughput sequencing of mGluR signaling pathway genes reveals enrichment of rare variants in autism’, *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4, pp. 11–14.

Kelleher, RJ, Govindarajan, A, Jung, H-Y, Kang, H, Tonegawa, S, Abel, T, Nguyen, PV, Barad, M, Deuel, TA, Kandel, ER, Bourtchouladze, R, Antoniadis, EA, McDonald, RJ, Barco, A, Alarcon, JM, Kandel, ER, Casadio, A, Martin, KC, Giustetto, M, Zhu, H, Chen, M, Bartsch, D, Bailey, CH, Kandel, ER, Chang, L, Karin, M, Chattarji, S, Stanton, PK, Sejnowski, TJ, Davis, HP, Squire, LR, Frankland, PW, Cestari, V, Filipkowski, RK,

McDonald, RJ, Silva, AJ, Frey, JU, Frey, U, Morris, RG, Frey, U, Frey, S, Schollmeier, F, Krug, M, Frey, U, Krug, M, Reymann, KG, Matthies, H, Gingras, AC, Raught, B, Sonenberg, N, Godsil, BP, Quinn, JJ, Fanselow, MS, Herbert, TP, Tee, AR, Proud, CG, Huang, YY, Kandel, ER, Impey, S, Obrietan, K, Storm, DR, Kandel, ER, Kang, H, Sun, LD, Atkins, CM, Soderling, TR, Wilson, MA, Tonegawa, S, Kim, JJ, Fanselow, MS, Lakso, M, Sauer, B, Mosinger, B, Lee, EJ, Manning, RW, Yu, SH, Mulder, KL, Westphal, H, Liu, G, Tsien, RW, Mansour, SJ, Matten, WT, Hermann, AS, Candia, JM, Rong, S, Fukasawa, K, Woude, GF, Vande, Ahn, NG, Martin, KC, Barad, M, Kandel, ER, Mazzucchelli, C, Brambilla, R, Mazzucchelli, C, Vantaggiato, C, Ciamei, A, Fasano, S, Pakhotin, P, et al. 2004, 'Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory.', *Cell*, vol. 116, no. 3, pp. 467–79.

Kennedy, MB 2000, 'Signal-Processing Machines at the Postsynaptic Density', *Science*, vol. 290, no. 5492, pp. 750–754.

Kerppola, TK 2009, 'Visualization of Molecular Interactions Using Analysis : Characteristics of Protein Fragment Complementation', *Chemical Society reviews*, vol. 38, no. 10, pp. 2876–2886.

Kerrisk, ME, Greer, CA & Koleske, AJ 2013, 'Integrin alpha3 is required for late postnatal stability of dendrite arbors, dendritic spines and synapses, and mouse behavior', *Journal of Neuroscience*, vol. 70, no. 4, pp. 646–656.

Kim, C-H, Takamiya, K, Petralia, RS, Sattler, R, Yu, S, Zhou, W, Kalb, R, Wenthold, R & Huganir, R 2005, 'Persistent hippocampal CA1 LTP in mice lacking the C-terminal PDZ ligand of GluR1.', *Nature neuroscience*, vol. 8, no. 8, pp. 985–987.

Kim, JH, Liao, D, Lau, LF & Huganir, RL 1998, 'SynGAP: A synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family', *Neuron*, vol. 20, no. 4, pp. 683–691.

Kinbara, K, Goldfinger, LE, Hansen, M, Chou, FL & Ginsberg, MH 2003, 'Ras GTPases: integrins' friends or foes?', *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 4, no. 1471–0072; 10, pp. 767–776.

Knox, AL & Brown, NH 2002, 'Rap1 GTPase Regulation of Adherens Junction Positioning and Cell Adhesion', *Science*, vol. 295, no. 5558, pp. 1285–1288.

Kodama, Y & Hu, CD 2012, 'Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives', *BioTechniques*, vol. 53, no. 5, pp. 285–298.

Kouser, M, Speed, HE, Dewey, CM, Reimers, JM, Widman, AJ, Gupta, N, Liu, S, Jaramillo, TC, Bangash, M, Xiao, B, Worley, PF & Powell, CM 2013, 'Loss of Predominant Shank3 Isoforms Results in Hippocampus-Dependent Impairments in Behavior and Synaptic Transmission', vol. 33, no. 47, pp. 18448–18468.

Kreienkamp, HJ 2008, 'Scaffolding Proteins at the Postsynaptic Density: Shank as the Architectural Framework', *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 186, pp. 365–380.

Leblond, CS, Nava, C, Polge, A, Gauthier, J, Huguet, G, Lumbroso, S, Giuliano, F, Stordeur, C, Depienne, C, Mouzat, K, Pinto, D, Howe, J, Lemièrre, N, Durand, CM, Guibert, J, Ey, E, Toro, R, Peyre, H, Mathieu, A, Amsellem, F, Rastam, M, Gillberg, IC, Rappold, G a., Holt, R, Monaco, AP, Maestrini, E, Galan, P, Heron, D, Jacquette, A, Afenjar, A, Rastetter, A, Brice, A, Devillard, F, Assouline, B, Laffargue, F, Lespinasse, J, Chiesa, J, Rivier, F, Bonneau, D, Regnault, B, Zelenika, D, Delepine, M, Lathrop, M, Sanlaville, D, Schluth-Bolard, C, Edery, P, Perrin, L, Tabet, AC, Schmeisser, MJ, Boeckers, TM, Coleman, M, Sato, D, Szatmari, P, Scherer, SW, Rouleau, G a., Betancur, C, Leboyer, M, Gillberg, C, Delorme, R & Bourgeron, T 2014, 'Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: A Gradient of Severity in Cognitive Impairments', *PLoS Genetics*, vol. 10, no. 9, p. e1004580.

Lee, J, Chung, C, Ha, S, Lee, D, Kim, D-Y, Kim, H & Kim, E 2015, 'Shank3-mutant mice lacking exon 9 show altered excitation/inhibition balance, enhanced rearing, and spatial memory deficit', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 9, no. March, pp. 1–14.

Lennertz, L, Wagner, M, Wölwer, W, Schuhmacher, A, Frommann, I, Berning, J, Schulze-Rauschenbach, S, Landsberg, MW, Steinbrecher, A, Alexander, M, Franke, PE, Pukrop, R, Ruhrmann, S, Bechdolf, A, Gaebel, W, Klosterkötter, J, Häfner, H, Maier, W & Mössner, R 2012, 'A promoter variant of SHANK1 affects auditory working memory in schizophrenia patients and in subjects clinically at risk for psychosis', *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, vol. 262, no. 2, pp. 117–124.

Levy, S, Mandell, D & Schultz, R 2009, 'Autism', *Lancet*, vol. 374, no. 9701, pp. 1627–1638.

Lilja, J, Zacharchenko, T, Georgiadou, M, Jacquemet, G, Franceschi, ND, Peuhu, E, Hamidi, H, Pouwels, J, Martens, V, Nia, FH, Beifuss, M, Boeckers, T, Kreienkamp, H-J, Barsukov, IL & Ivaska, J 2017, 'SHANK proteins limit integrin activation by directly interacting with Rap1 and R-Ras', *Nature Cell Biology*.

Lilja, J, Zacharchenko, T, Georgiadou, M, Jacquemet, G, Franceschi, NDND, Peuhu, E,

- Hamidi, H, Pouwels, J, Martens, V, Nia, FHFH, Beifuss, M, Boeckers, T, Kreienkamp, H-JH-J, Barsukov, ILIL & Ivaska, J 2017, 'SHANK proteins limit integrin activation by directly interacting with Rap1 and R-Ras', *Nature Cell Biology*, vol. 19, no. 4.
- Lim, S, Sala, C, Yoon, J, Park, S, Kuroda, S, Sheng, M & Kim, E 2001, 'Sharpin , a Novel Postsynaptic Density Protein That Directly Interacts with the Shank Family of Proteins', *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 397, no. 17, pp. 385–397.
- Lin, AW & Man, HY 2013, 'Ubiquitination of neurotransmitter receptors and postsynaptic scaffolding proteins', *Neural Plasticity*, vol. 2013, no. Figure 1.
- Liu, X, Huai, J, Endle, H, Deller, T, Nitsch, R & Vogt, J 2016, 'PRG-1 Regulates Synaptic Plasticity via Intracellular Article PRG-1 Regulates Synaptic Plasticity via Intracellular PP2A / b 1-Integrin Signaling', *Developmental Cell*, vol. 38, pp. 1–16.
- Ludwig, KU, Mattheisen, M, Mühleisen, TW, Roeske, D, Schmä, C, Breuer, R, Schulte-Körne, G, Müller-Myhsok, B, Nöthen, MM, Hoffmann, P, Rietschel, M & Cichon, S 2009, 'Supporting evidence for LRRTM1 imprinting effects in schizophrenia.', *Molecular psychiatry*, vol. 14, pp. 743–745.
- Macgillavry, HD, Kerr, JM, Kassner, J, Frost, NA & Blanpied, TA 2016, 'flexibility of neuronal spines and synapses', vol. 43, no. 2, pp. 179–193.
- Maldonado, H, Calderon, C, Burgos-Bravo, F, Kobler, O, Zuschratter, W, Ramirez, O, Härtel, S, Schneider, P, Quest, AFG, Herrera-Molina, R & Leyton, L 2017, 'Astrocyte-to-neuron communication through integrin-engaged Thy-1/CBP/Csk/Src complex triggers neurite retraction via the RhoA/ROCK pathway', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1864, Elsevier B.V., no. 2, pp. 243–254.
- Mameza, MG, Dvoretzkova, E, Bamann, M, Hönck, HH, Güler, T, Boeckers, TM, Schoen, M, Verpelli, C, Sala, C, Barsukov, I, Dityatev, A & Kreienkamp, HJ 2013, 'SHANK3 gene mutations associated with autism facilitate ligand binding to the shank3 ankyrin repeat region', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, pp. 26697–26708.
- Mei, Y, Monteiro, P, Zhou, Y, Kim, J, Gao, X, Fu, Z & Feng, G 2016, 'Adult restoration of Shank3 expression rescues selective autistic-like phenotypes', *Nature*, Nature Publishing Group, pp. 1–17.
- Miller, KE, Kim, Y, Huh, W-K & Park, H-O 2015, 'Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis: Advances and recent applications for genome-wide

interaction studies', *Journal of Molecular Biology*, vol. 427, Elsevier B.V., no. 11, pp. 2039–2055.

Mowry, BJ, Holmans, P a, Pulver, a E, Gejman, P V, Riley, B, Williams, NM, Laurent, C, Schwab, SG, Wildenauer, DB, Bauché, S, Owen, MJ, Wormley, B, Sanders, a R, Nestadt, G, Liang, KY, Duan, J, Ribble, R, Norton, N, Soubigou, S, Maier, W, Ewen-White, KR, DeMarchi, N, Carpenter, B, Walsh, D, Williams, H, Jay, M, Albus, M, Nertney, D a, Papadimitriou, G, O'Neill, A, O'Donovan, MC, Deleuze, J-F, Lerer, FB, Dikeos, D, Kendler, KS, Mallet, J, Silverman, JM, Crowe, RR & Levinson, DF 2004, 'Multicenter linkage study of schizophrenia loci on chromosome 22q.', *Molecular psychiatry*, vol. 9, no. 8, pp. 784–95.

Myung, JK, Dunah, AW, Yu, TW & Sheng, M 2005, 'Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking', *Neuron*, vol. 46, no. 5, pp. 745–760.

Naisbitt, S, Eunjoon, K, Tu, JC, Xiao, B, Sala, C, Valtschanoff, J, Weinberg, RJ, Worley, PF & Sheng, M 1999, 'Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin', *Neuron*, vol. 23, no. 3, pp. 569–582.

O'Brien, RJ, Lau, L-F & Huganir, RL 1998, 'Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at excitatory synapses', *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 8, no. 3, pp. 364–369.

van Os, J & Kapur, S 2009, 'Schizophrenia', *The Lancet*, vol. 374, no. 9690, pp. 635–645.

Pan, B-X, Vautier, F, Ito, W, Bolshakov, VY & Morozov, A 2008, 'Enhanced cortico-amygdala efficacy and suppressed fear in absence of Rap1.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 28, no. 9, pp. 2089–98.

Park, E, Na, M, Choi, J, Kim, S, Lee, JR, Yoon, J, Park, D, Sheng, M & Kim, E 2003, 'The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the β PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 21, pp. 19220–19229.

Park, YK & Goda, Y 2016, 'Integrins in synapse regulation', *Nature Publishing Group*, vol. 17, Nature Publishing Group, no. 12, pp. 745–756.

Patterson, MA, Szatmari, EM & Yasuda, R 2010, 'AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 36, pp. 15951–

15956.

Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu B-E, Karandikar M, Berman K & Cobb MH 2001, 'Mitogen-activated protein(MAP) Kinase pathways: Regulation and Physiological Functions', *Endocrine Reviews*, vol. 22, no. 2, pp. 153–183.

Peça, J, Feliciano, C, Ting, JT, Wang, W, Wells, MF, Venkatraman, TN, Lascola, CD & Fu, Z 2011, 'Shank3 mutant mice display autistic-like behaviors and striatal dysfunction', *Nature*, vol. 472, no. 7344, pp. 437–442.

Peça, J, Ting, J & Feng, G 2011, 'SnapShot: Autism and the synapse', *Cell*, vol. 147, Elsevier, no. 3, p. 706–706.e1.

Penzes, P, Woolfrey, KM & Srivastava, DP 2011, 'Epac2-mediated dendritic spine remodeling: implications for disease.', *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 46, Elsevier B.V., no. 2, pp. 368–80.

Peykov, S, Berkel, S, Schoen, M, Weiss, K, Degenhardt, F, Strohmaier, J, Weiss, B, Proepper, C, Schrott, G, Nöthen, MM, Boeckers, TM, Rietschel, M & Rappold, GA 2015, 'Identification and functional characterization of rare SHANK2 variants in schizophrenia', *Molecular Psychiatry*, vol. 20, no. 12, pp. 1489–1498.

Pham, E, Crews, L, Ubhi, K, Hansen, L, Adame, A, Cartier, A, Salmon, D, Galasko, D, Michael, S, Savas, JN, Yates, JR, Glabe, C & Masliah, E 2010, 'Progressive accumulation of amyloid-beta oligomers in Alzheimer's disease and in amyloid precursor protein transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins.', *The FEBS journal*, vol. 277, no. 14, pp. 3051–67.

Picchioni, MM & Murray, RM 2007, 'Schizophrenia', *Bmj*, vol. 335, no. 7610, pp. 91–95.

Pinto, D, Pagnamenta, AT, Klei, L, Anney, R, Merico, D, Regan, R, Conroy, J, Magalhaes, TR, Correia, C, Brett, S, Almeida, J, Bacchelli, E, Bader, GD, Bailey, AJ, Baird, G, Battaglia, A, Berney, T, Bolshakova, N, Bölte, S, Bolton, PF, Bourgeron, T, Brennan, S, Brian, J, Susan, E, Carson, AR, Casallo, G, Casey, J, Cochrane, L, Corsello, C, Crawford, EL, Crossett, A, Dawson, G, Jonge, M De, Delorme, R, Drmic, I, Duketis, E, Fombonne, E, Freitag, CM, Gilbert, J, Glessner, JT, Goldberg, J, Green, A, Green, J, Guter, SJ, Hakonarson, H, Heron, E a, Hill, M, Howe, JL, Hughes, G, Hus, V, Iglizzi, R, Klauck, SM, Kolevzon, A & Korvatska, O 2010, 'Functional Impact of Global Rare Copy Number Variation in Autism Spectrum Disorder', *Nature*, vol. 466, no. 7304, pp. 368–372.

- Prior, IA, Harding, A, Yan, J, Sluimer, J, Parton, RG & Hancock, JF 2001, 'GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity.', *Nature cell biology*, vol. 3, no. 4, pp. 368–375.
- Purves, D, Augustine, GJ, Fitzpatrick, D, Hall, WC, Lamantia, A-S, Mcnamara, JO & Willians, SM 2004, *Neuroscience, Sunderland*, vol. 3.
- Qin, Y, Zhu, Y, Baumgart, JP, Stornetta, RL, Seidenman, K, Mack, V, Aelst, L Van & Zhu, JJ 2005, 'State-dependent Ras signaling and AMPA receptor trafficking', pp. 2000–2015.
- Qualmann, B 2004, 'Linkage of the Actin Cytoskeleton to the Postsynaptic Density via Direct Interactions of Abp1 with the ProSAP/Shank Family', *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 10, pp. 2481–2495.
- Raaijmakers, JH & Bos, JL 2009, 'Specificity in Ras and Rap signaling', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 17, pp. 10995–10999.
- Rantala, JK, Pouwels, J, Pellinen, T, Veltel, S, Laasola, P, Humphries, M, Parsons, M, Salmi, M & Ivaska, J 2012, 'SHARPIN is an endogenous inhibitor of beta1-integrin activation', *Nature cell biology*, vol. 13, no. 11, pp. 1315–1324.
- Redecker, P, Bockmann, J & Böckers, TM 2006, 'Expression of postsynaptic density proteins of the ProSAP/Shank family in the thymus', *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 126, no. 6, pp. 679–685.
- Redecker, P, Gundelfinger, ED & Boeckers, TM 2001, 'The Cortactin-binding Postsynaptic Density Protein ProSAP1 in Non-neuronal Cells', *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 49, no. 5, pp. 639–648.
- Redecker, P, Kreutz, MR, Bockmann, J, Gundelfinger, ED & Boeckers, TM 2003, 'Brain synaptic junctional proteins at the acrosome of rat testicular germ cells.', *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, vol. 51, no. 6, pp. 809–19.
- Reim, D, Weis, TM, Halbedl, S, Delling, JP, Grabrucker, AM, Boeckers, TM & Schmeisser, MJ 2016, 'The Shank3 Interaction Partner ProSAPiP1 Regulates Postsynaptic SPAR Levels and the Maturation of Dendritic Spines in Hippocampal Neurons', *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, vol. 8, no. May, pp. 1–9.
- Romorini, S, Piccoli, G, Jiang, M, Grossano, P, Tonna, N, Passafaro, M, Zhang, M & Sala, C

2004, 'A functional role of postsynaptic density-95-guanylate kinase-associated protein complex in regulating Shank assembly and stability to synapses.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 24, no. 42, pp. 9391–9404.

Rosti, RO, Sadek, A a., Vaux, KK & Gleeson, JG 2014, 'The genetic landscape of autism spectrum disorders', *Developmental Medicine and Child Neurology*, vol. 56, pp. 12–18.

Ryu, J, Futai, K, Feliu, M, Weinberg, R & Sheng, M 2009, 'Constitutively Active Rap2 Transgenic Mice Display Fewer Dendritic Spines, Reduced Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling, Enhanced Long-Term Depression, and Impaired Spatial Learning and Fear Extinction', *Neuroscience Research*, vol. 28, no. 33, pp. 8178–8188.

Sandin, S, Lichtenstein, P, Larsson, H, Cm, H & Reichenberg, A 2014, 'The familial risk of autism', *JAMA*, vol. 311, no. 17, pp. 1770–1777.

Sato, D, Lionel, AC, Leblond, CS, Prasad, A, Pinto, D, Walker, S, O'Connor, I, Russell, C, Drmic, IE, Hamdan, FF, Michaud, JL, Endris, V, Roeth, R, Delorme, R, Huguet, G, Leboyer, M, Rastam, M, Gillberg, C, Lathrop, M, Stavropoulos, DJ, Anagnostou, E, Weksberg, R, Fombonne, E, Zwaigenbaum, L, Fernandez, BA, Roberts, W, Rappold, GA, Marshall, CR, Bourgeron, T, Szatmari, P & Scherer, SW 2012, 'SHANK1 deletions in males with autism spectrum disorder', *American Journal of Human Genetics*, vol. 90, The American Society of Human Genetics, no. 5, pp. 879–887.

Scannevin, RH & Huganir, RL 2000, 'Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses.', *Nature reviews. Neuroscience*, vol. 1, no. 2, pp. 133–141.

Schmeisser, M, Zhang, X, Ey, E, Wegener, S, Bockmann, J, Stempel, AV, Kuebler, A, Janssen, A, Udvardi, PT, Shiban, E, Spilker, C, Balschun, D, Skryabin, B V, Dieck, S, Smalla, K, Montag, D, Leblond, CS, Faure, P, Torquet, N, Bourgeron, T, Gundelfinger, ED & Boeckers, TM 2012, 'Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2', *Nature*, vol. 486, Nature Publishing Group, no. 7402, pp. 256–260.

Schuetz, G, Rosário, M, Grimm, J, Boeckers, TM, Gundelfinger, ED & Birchmeier, W 2004, 'The neuronal scaffold protein Shank3 mediates signaling and biological function of the receptor tyrosine kinase Ret in epithelial cells', *Journal of Cell Biology*, vol. 167, pp. 945–952.

Sebat, J, Lakshmi, B, Malhotra, D, Troge, J, Lese-martin, C, Walsh, T, Yamrom, B, Yoon, S,

Krasnitz, A, Kendall, J, Leotta, A, Pai, D, Zhang, R, Lee, Y, Hicks, J, Spence, SJ, Lee, AT, Puura, K, Lehtimäki, T, Ledbetter, D, Gregersen, PK, Bregman, J, Sutcliffe, JS, Jobanputra, V, Chung, W & Warburton, D 2007, 'Number Mutations with Autism', vol. 316, no. April, pp. 445–450.

Selkoe, DJ 1993, 'Physiological production of the β -amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease', *Trends in Neurosciences*, vol. 16, no. 10, pp. 403–409.

Selkoe, J 1989, 'Amyloid p Protein Precursor and the Pathogenesis of Alzheimer ' s Disease Minireview', vol. 58, pp. 611–612.

Serchov, T, Jilg, A, Wolf, CT, Radtke, I, Stehle, JH & Heumann, R 2015, 'Ras Activity Oscillates in the Mouse Suprachiasmatic Nucleus and Modulates Circadian Clock Dynamics', *Molecular Neurobiology*.

Seymour, RE, Hasham, MG, Cox, GA, Shultz, LD, Hogenesch, H, Roopenian, DC & Sundberg, JP 2007, 'Spontaneous mutations in the mouse Sharpin gene result in multiorgan inflammation , immune system dysregulation and dermatitis', *Genes and Immunity*, no. 8, pp. 416–421.

Shah, B, Lutter, D, Bochenek, ML, Kato, K, Tsytsyura, Y, Glyvuk, N, Sakakibara, A, Klingauf, J, Adams, RH & Püschel, AW 2016, 'C3G/Rapgef1 is required in multipolar neurons for the transition to a bipolar morphology during cortical development', *PLoS ONE*, vol. 11, no. 4, pp. 1–22.

Shah, B, Lutter, D, Tsytsyura, Y, Glyvuk, N, Sakakibara, A, Klingauf, J & Püschel, AW 2017, 'Rap1 GTPases Are Master Regulators of Neural Cell Polarity in the Developing Neocortex', *Cerebral Cortex*, no. 27, pp. 1253–1269.

Sheng, M & Kim, E 2000, 'The Shank family of scaffold proteins.', *Journal of cell science*, vol. 113, pp. 1851–1856.

Shi, Y & Ethell, IM 2006, 'Integrins Control Dendritic Spine Plasticity in Hippocampal Neurons through NMDA Receptor and Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II-Mediated Actin Reorganization', *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 6, pp. 1813–1822.

Silverman, JL, Turner, SM, Barkan, CL, Tolu, SS, Hung, AY, Sheng, M & Crawley, JN 2012, 'Sociability and Motor Functions in Shank2 Mutant Mice', *Brain Research*, no. 1380, pp. 120–137.

Sisodia, SS & Price, DL 1995, 'Role of the 3-amyloid in Alzheimer ' s Maryland', *Faseb*, vol. 9, no. 5, pp. 366–370.

Soltau, M 2002, 'The Insulin Receptor Substrate IRSp53 Links Postsynaptic shank1 to the Small G-Protein cdc42', *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 21, no. 4, pp. 575–583.

Srivastava, DP, Woolfrey, KM, Jones, KA, Anderson, CT, Smith, KR, Russell, TA, Lee, H, Yasvoina, M V., Wokosin, DL, Ozdinler, PH, Shepherd, GMG & Penzes, P 2012, 'An autism-associated variant of epac2 reveals a role for ras/epac2 signaling in controlling basal dendrite maintenance in mice', *PLoS Biology*, vol. 10, no. 6.

Stefansson, H, Sigurdsson, E, Steinthorsdottir, V, Bjornsdottir, S, Sigmundsson, T, Ghosh, S, Brynjolfson, J, Gunnarsdottir, S, Ivarsson, O, Chou, TT, Hjaltason, O, Birgisdottir, B, Jonsson, H, Gudnadottir, VG, Gudmundsdottir, E, Bjornsson, A, Ingvarsson, B, Ingason, A, Sigfusson, S, Hardardottir, H, Harvey, RP, Lai, D, Zhou, M, Brunner, D, Mutel, V, Gonzalo, A, Lemke, G, Sainz, J, Johannesson, G, Andresson, T, Gudbjartsson, D, Manolescu, A, Frigge, ML, Gurney, ME, Kong, A, Gulcher, JR, Petursson, H & Stefansson, K 2002, 'Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia.', *American journal of human genetics*, vol. 71, pp. 877–892.

Straub, RE, Jiang, Y, MacLean, CJ, Ma, Y, Webb, BT, Myakishev, M V., Harris-Kerr, C, Wormley, B, Sadek, H, Kadambi, B, Cesare, AJ, Gibberman, A, Wang, X, O'Neill, FA, Walsh, D & Kendler, KS 2002, 'Genetic Variation in the 6p22.3 Gene DTNBP1, the Human Ortholog of the Mouse Dysbindin Gene, Is Associated with Schizophrenia', *The American Journal of Human Genetics*, vol. 71, no. 2, pp. 337–348.

Sun, J, Kuo, PH, Riley, BP, Kendler, KS & Zhao, Z 2008, 'Candidate genes for schizophrenia: A survey of association studies and gene ranking', *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, vol. 147, no. 7, pp. 1173–1181.

Takashima, N, Odaka, YS, Sakoori, K, Akagi, T, Hashikawa, T, Morimura, N, Yamada, K & Aruga, J 2011, 'Impaired cognitive function and altered hippocampal synapse morphology in mice lacking LRRTM1, a gene associated with schizophrenia', *PLoS ONE*, vol. 6, no. 7, pp. 1–14.

Tandon, R, Nasrallah, HA & Keshavan, MS 2009, 'Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization', *Schizophrenia Research*, vol. 110, Elsevier B.V., no. 1–3, pp. 1–23.

- Thomas, GM & Huganir, RL 2004, 'MAPK Cascade Signaling and Synaptic Plasticity', *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 5, no. March, pp. 173–183.
- Tokunaga, F, Nakagawa, T, Nakahara, M, Saeki, Y, Taniguchi, M, Sakata, S, Tanaka, K, Nakano, H & Iwai, K 2011, 'SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex', *Nature*, vol. 471, Nature Publishing Group, no. 7340, pp. 633–636.
- Tu, JC, Xiao, B, Naisbitt, S, Yuan, JP, Petralia, RS, Brakeman, P, Doan, A, Aakalu, VK, Lanahan, AA, Sheng, M & Worley, PF 1999, 'Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins', *Neuron*, vol. 23, no. 3, pp. 583–592.
- Tucker, BA, Rahimtula, M & Mearow, KM 2005, 'Integrin activation and neurotrophin signaling cooperate to enhance neurite outgrowth in sensory neurons', *Journal of Comparative Neurology*, vol. 486, no. 3, pp. 267–280.
- Verhoeff, B 2015, 'Fundamental challenges for autism research: the science–practice gap, demarcating autism and the unsuccessful search for the neurobiological basis of autism', *Medicine, Health Care and Philosophy*.
- Vicidomini, C, Ponzoni, L, Lim, D, Schmeisser, MJ, Reim, D, Morello, N, Orellana, D, Tozzi, A, Durante, V, Scalmani, P, Mantegazza, M, Genazzani, AA, Giustetto, M, Sala, M, Calabresi, P, Boeckers, TM, Sala, C & Verpelli, C 2016, 'Pharmacological enhancement of mGlu5 receptors rescues behavioral deficits in SHANK3 knock-out mice', *Molecular Psychiatry*.
- Wang, CC, Held, RG & Hall, BJ 2013, 'SynGAP regulates protein synthesis and homeostatic synaptic plasticity in developing cortical networks', *PLoS ONE*, vol. 8, no. 12.
- Wang, X, McCoy, P a., Rodriguiz, RM, Pan, Y, Je, HS, Roberts, AC, Kim, CJ, Berrios, J, Colvin, JS, Bousquet-Moore, D, Lorenzo, I, Wu, G, Weinberg, RJ, Ehlers, MD, Philpot, BD, Beaudet, AL, Wetsel, WC & Jiang, YH 2011, 'Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3', *Human Molecular Genetics*, vol. 20, no. 15, pp. 3093–3108.
- Wang, X, Xu, Q, Bey, AL, Lee, Y & Jiang, Y 2014, 'Transcriptional and functional complexity of Shank3 provides a molecular framework to understand the phenotypic heterogeneity of SHANK3 causing autism and Shank3 mutant mice', *Molecular Autism*, vol.

5, no. 1, p. 30.

Wes, ASD, Table, S, Fig, ED & Hiseq, I 2014, 'Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism', *Nature*, vol. 515, Nature Publishing Group, no. 7526, pp. 209–215.

Wiens, KM 2005, 'Rac1 Induces the Clustering of AMPA Receptors during Spinogenesis', *Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 46, pp. 10627–10636.

Wöhr, M 2014, 'Ultrasonic vocalizations in Shank mouse models for autism spectrum disorders: Detailed spectrographic analyses and developmental profiles', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 43, Elsevier Ltd, pp. 199–212.

Wöhr, M, Roulet, FI, Hung, AY, Sheng, M & Crawley, JN 2011, 'Communication impairments in mice lacking shank1: Reduced levels of ultrasonic vocalizations and scent marking behavior', *PLoS ONE*, vol. 6, no. 6.

Won, H, Lee, H-R, Gee, HY, Mah, W, Kim, J-I, Lee, J, Ha, S, Chung, C, Jung, ES, Cho, YS, Park, S-G, Lee, J-S, Lee, K, Kim, D, Bae, YC, Kaang, B-K, Lee, MG & Kim, E 2012, 'Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function', *Nature*, vol. 486, Nature Publishing Group, no. 7402, pp. 261–265.

Woolfrey, KM, Srivastava, DP, Photowala, H, Yamashita, M, Barbolina, M V, Cahill, ME, Xie, Z, Jones, K a, Quilliam, L a, Prakriya, M & Penzes, P 2009, 'Epac2 induces synapse remodeling and depression and its disease-associated forms alter spines.', *Nature neuroscience*, vol. 12, Nature Publishing Group, no. 10, pp. 1275–1284.

Woolfrey, KM, Srivastava, DP, Photowala, H, Yamashita, M, Prakriya, M & Penzes, P 2010, 'Epac2 induces synapse remodeling and depression and its disease-associated forms alter spine morphology', *Nature Neuroscience*, vol. 12, no. 10, pp. 1275–1284.

Wu, GY, Deisseroth, K & Tsien, RW 2001, 'Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology', *Nature neuroscience*, vol. 4, no. 2, pp. 151–158.

Xie, Z, Huganir, RL & Penzes, P 2005, 'Activity-dependent dendritic spine structural plasticity is regulated by small GTPase Rap1 and its target AF-6', *Neuron*, vol. 48, no. 4, pp. 605–618.

Xie, Z, Srivastava, DP, Photowala, H, Kai, L, Cahill, ME, Kevin, M, Shum, CY, Surmeier, DJ & Penzes, P 2008, 'Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of

dendritic spines', *NIH Public Access*, vol. 56, no. 4, pp. 640–656.

Yang, M, Bozdagi, O, Scattoni, ML, Wöhr, M, Roulet, FI, Zhang, JY, Harris, MJ, Saxena, R & Silverman, JL 2012, 'Reduced Excitatory Neurotransmission and Mild Autism- Relevant Phenotypes in Adolescent Shank3 Null Mutant Mice', *J*, vol. 32, no. 19, pp. 6525–6541.

Yi-Lei, Z, Ruo-Chen, W, Ken, C, Brian Z., R, Li, S, Yi-Lei, Z, Ruo-Chen, W, Ken, C, Brian Z., R & Li, S 2017, 'Roles of Rap1 signaling in tumor cell migration and invasion', *Cancer Biology & Medicine*, vol. 14, no. 1, pp. 90–99.

Yoo, J, Bakes, J, Bradley, C, Collingridge, GL & Kaang, B 2014, 'Shank mutant mice as an animal model of autism.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, vol. 369, no. December 2013, p. 20130143.

Zeng, M, Shang, Y, Guo, T, He, Q, Yung, W-H, Liu, K & Zhang, M 2016, *A binding site outside the canonical PDZ domain determines the specific interaction between Shank and SAPAP and their function*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 113(22):E3081-90.

Zhao, Z, Webb, BT, Jia, P, Bigdeli, TB, Maher, BS, van den Oord, E, Bergen, SE, Amdur, RL, O'Neill, FA, Walsh, D, Thiselton, DL, Chen, X, Pato, CN, Riley, BP, Kendler, KS & Fanous, AH 2013, 'Association Study of 167 Candidate Genes for Schizophrenia Selected by a Multi-Domain Evidence-Based Prioritization Algorithm and Neurodevelopmental Hypothesis', *PLoS ONE*, vol. 8, no. 7.

Zhou, Y, Kaiser, T, Zhang, X, Goes, MS Van Der & Wang, D 2015, 'Mice with Shank3 Mutations Associated with ASD and Schizophrenia Display Both Shared and Distinct Article Mice with Shank3 Mutations Associated with ASD and Schizophrenia Display Both Shared and Distinct Defects', *Neuron*, pp. 1–16.

Zhu, JJ, Qin, Y, Zhao, M, Van Aelst, L & Malinow, R 2002, 'Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity', *Cell*, vol. 110, no. 4, pp. 443–455.

Ziff, EB 1997, 'Enlightening the Postsynaptic Density Review', *Neuron*, vol. 19, pp. 1163–1174.

Zitzer, H, Richter, D & Kreienkamp, H 1999, 'Agonist-dependent Interaction of the Rat Somatostatin Receptor Subtype 2 with Cortactin-binding Protein 1', *J Biol Chem*, vol. 274, no. 26, pp. 18153–18156.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau einer Nervenzelle.....	1
Abbildung 2 Shank3-Isoformen und Bindungsstellen bekannter Interaktionspartner.	5
Abbildung 3 Domänenstruktur des Shank3-Proteins und SHANK-Varianten in Patienten mit Autismus-Spektrum-Störungen.	12
Abbildung 4 Drei-dimensionale Struktur der Shank3 SPN-ARR Region.	13
Abbildung 5 Ergebnis einer Genotypisierungs-PCR von Shank3 WT (+/+), Shank3-heterozygoter (+/-) und Shank3-defizienter (-/-) Maus.....	36
Abbildung 6 Immunzytochemische Analyse der Lokalisation von endogenem Shank3, Shank3-WT und den Mutanten Shank3-L68P und Shank3-R12C.....	47
Abbildung 7 Lokalisation von Shank3-WT und HRas-WT in hippocampalen Neuronen.	48
Abbildung 8 Protein-Protein-Bindungsanalyse von Shank3 und HRas mittels immunzytochemischer Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementationsanalyse.	50
Abbildung 9 Durchflusszytometrische Auswertung der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation durch Shank3 und HRas.	51
Abbildung 10 Protein-Protein-Bindungsanalyse von Shank3 und Rap1 mittels durchflusszytochemischer Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementationsanalyse.....	52
Abbildung 11 Analyse von mit SynGAP-Knockdown-Virus infizierten cortikalen Neuronen mittels Immunblot zur Untersuchung der Effizienz.....	54
Abbildung 12 Untersuchung der MAP-Kinase-Aktivität von cortikalen Ratten-Neuronen nach Infektion mit einem SynGAP-Knockdown-Virus.....	55
Abbildung 13 Analyse der Shank3-Lokalisation in Abhängigkeit von der Rap-Aktivierung mittels 8-CPT.	57
Abbildung 14 Schematische Darstellung des GFP-SPN-ARR-mCherry-Konstrukts, bei dem GFP als Donor und mCherry als Akzeptor fungiert.....	58
Abbildung 15 Analyse des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers bei HEK293T-Zellen, die mit GFP-Shank3-mCherry-Konstrukten (WT, L68P, R12C) und HRas-WT kotransfiziert wurden, zur Untersuchung der Konformationsänderung von Shank3 in Abhängigkeit von der Ras-Aktivierung.	59
Abbildung 16 Durchflusszytometrische Messung der FRET-Signalintensität bei HEK293T-Zellen, die mit GFP-Shank3-mCherry-Konstrukten transfiziert wurden.....	61

Abbildung 17 Analyse der postsynaptischen Dichte von Shank3-WT und Shank3 $\alpha\beta^{-/-}$ -Mäusen bezüglich der Menge von Ras-Proteinen.	63
Abbildung 18 Aktivität der MAPK- und Akt-Signalwege im Gehirn Shank3-defizienter Mäuse.	64
Abbildung 19 Untersuchung der Rap1-abhängigen Neuritenentwicklung in Shank3 WT oder L68P überexprimierenden corticalen Neuronen.	66
Abbildung 20 Durchflusszytometrische Bestimmung der Integrinaktivität bei adulten Shank3-defizienten und Shank3-Wildtyp Mäusen.	67
Abbildung 21 Immunhistochemische Färbung von Gesamt-Integrin bei Shank3-defizienten (KO) Mäusen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen.	69
Abbildung 22 Immunhistochemische Färbung von aktivem Integrin bei Shank3-defizienten (KO) Mäusen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen.	70
Abbildung 23 Untersuchung des Einflusses von Shank3 auf die Integrinaktivierung.	71
Abbildung 24 Schematische Darstellung der Rolle von Shank3 als Negativ-Regulator der Integrinaktivierung.	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 SynGAP-RNAi-Oligonukleotide	27
Tabelle 2 Sequenzierungsprimer	27
Tabelle 3 Genotypisierungsprimer	27
Tabelle 4: Primärantikörper	28
Tabelle 5: Sekundärantikörper	28
Tabelle 6 Zusammensetzung des verwendeten LB-Mediums und LB-Agars mit Angabe der eingesetzten Antibiotikakonzentrationen.	30
Tabelle 7 Restriktionsansatz.....	32
Tabelle 8 Ligationsansatz.....	34
Tabelle 9 PCR-Ansatz zur Genotypisierung von Mäusen einer Shank3-defizienten Mauslinie	35
Tabelle 10 PCR-Programm zur Genotypisierung von Shank3-Knockout-Mäusen.	36
Tabelle 11 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.....	37

Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp und den Kollegen des humangenetischen Instituts im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf bedanken. Mein Dank gilt besonders Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp für die Möglichkeit an diesem interessanten Forschungsprojekt arbeiten zu dürfen, in zahlreichen Seminaren die Arbeit gemeinsam mit den Kollegen zu besprechen und die Möglichkeit jederzeit wichtige Fragestellungen direkt zu besprechen.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei der Dr. Hans Ritz und Lieselotte Ritz Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes und die Einladungen zum jährlichen Sommerfest auf der schönen Dachterasse im japanischen Stil bedanken.

Des Weiteren möchte ich auch meiner Co-Betreuerin Prof. Dr. Julia Kehr für ihre Unterstützung danken. Ebenso möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Matthias Kneussel sehr herzlich für die Betreuung, hilfreiche Anmerkungen und Vorschläge danken.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Hans-Hinrich Hoenck für die großartige Labororganisation, seine Unterstützung bei der Klonierung bedanken und seine Gesellschaft bei der Kaffee- bzw. Tee-Pause bedanken. Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Judith Koliwer für ihre große Unterstützung, die sehr gute Zusammenarbeit und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Ganz besonders möchte ich mich auch bei Fatemeh Hassani-Nia für die tolle Zusammenarbeit bedanken, die zur Veröffentlichung im Journal Nature Cell Biology geführt hat. Und auch Prof. Dr. Stefan Kindler möchte ich für seine zahlreichen hilfreichen Anmerkungen bei den Institutsseminaren und seine Unterstützung bei der Neuronenkultur ganz herzlich danken, um die Qualität der Neuronenkultur zu verbessern und die Transfektionseffizienz zu steigern. Mein Dank gilt ebenfalls Malte Klüssendorf, Theresa Moormann, Malte Beifuss, André Friedrich, Claudia Schob, Gemma Bruno, Edward Pan und Ilaria Manucci, mit denen ich sehr gerne zusammengearbeitet habe. Zusätzlich möchte ich mich bei den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Kerstin Kutsche und PD Dr. Georg Rosenberger für die gemeinsamen Seminare und sehr hilfreichen Anmerkungen bedanken. Und ich möchte mich auch ganz herzlich bei Susanne Makowicki für Ihre Unterstützung und die zuverlässige Bereitstellung von Labormaterialien bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls dem DFG-geförderten Graduiertenkolleg GRK1459 „Sortierung und Interaktionen zwischen Proteinen subzellulärer Kompartimente“ für den wissenschaftlichen

Austausch, die zahlreichen Seminare und die Möglichkeit, mehrere Konferenzen besuchen zu können. Ins Besondere möchte ich hierbei Prof. Dr. Thomas Braulke und Dr. Dorthe Labonté für die hervorragende Organisation bedanken.

Weiterhin möchte ich mich auch bei Jasmine Pahle und Dr. Bianka Brunne für die Einführung in die Methodik der Immunhistochemie und die Organisation der schönen Abende zum Netzwerken ganz herzlich bedanken.

Hiermit möchte ich mich auch ganz besonders für die Unterstützung von Dr. Virgilio Failla (UKE microcopy facility), Regine Thiele und Susanne Roscher (FACS Sorting Core Unit) bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei Tanja Stößner, Anja Hüber, Jasmin Seydler, Ivonne Deutschmann und Andreas Süllau für die zuverlässige Betreuung und besonders gute Pflege der Ratten und Mäuse bedanken.

Besonderer Dank gilt auch meinen engen Freunden und meiner Familie für die mentale Unterstützung, die mir sehr geholfen hat.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Kollegen ganz herzlich dafür bedanken, dass sowohl Arbeit als auch Pausen eine Freude waren! Ich bin sehr froh, dass sich während der Arbeit so gute Freundschaften entwickelt haben.

Lebenslauf

Name Victoria Isabel Martens
Geburtsdatum 24.04.1985
Geburtsort Jever
Adresse Wiesenstr. 26
20255 Hamburg
Email victoria.martens@gmx.de
Mobil 0157-70889004

Ausbildung

- Seit 07/2013** UKE, Institut für Humangenetik, AG Kreienkamp
Doktorandin
Assoziiertes Mitglied des DFG-geförderten Graduiertenkollegs 1459
Finanziell unterstützt von der Dr. Hans Ritz und Lieselotte Ritz Stiftung
- 10/2010-01/2013** Universität Hamburg
Molecular Life Sciences
Thesis: Analyse der p21-aktivierten Proteinkinase (PAK)-abhängigen Regulation von Zellproliferation und Überleben bei der akuten lymphatischen Leukämie des Kindesalters
Betreuer: Dr. Kevin Dierck (Kinderkrebs-Zentrum Hamburg)
Abschluss: Master of Science
- 10/2007-08/2010** Universität Hamburg
Molecular Life Sciences
Thesis: Agonisten-Screening der Tropomyosin Rezeptor Kinase B unter Verwendung eines Zellbasierten Assays
Betreuer: Dr. Andreas F. Kahrs (Evotec AG)
Abschluss: Bachelor of Science
- 08/2005-07/2007** Gewerbeschule für Technische Assistenz G13, Hamburg
Ausbildung zur Biologisch-Technischen Assistentin
Praktika: Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (Virologie), Institut für Hygiene und Umwelt (Wasser-Analyse), Universität Hamburg (Molekularbiologie der Pflanzen)
- 10/2004-07/2005** Universität Hamburg
Bioinformatik
- 06/2004** Carl- von-Ossietzky Gymnasium, Bonn
Abitur

Arbeitserfahrung während des Studiums

- 07/2012–
02/2013** Forschungszentrum des Kinderkrebszentrums Hamburg
Signaltransduktion
Studentische Hilfskraft
- 01/2011–
06/2012** Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
II. Medizinische Klinik und Poliklinik, AG Tumorummunologie
Studentische Hilfskraft
- 11/2009–
10/2010** Evotec AG
Zentrale Zellkultur
Werksstudentin
- 04/2008–
07/2009** Universität Hamburg
Molekularbiologie für Pflanzen
Studentische Hilfskraft

Praktika während des Studiums

- 01/2012–
03/2012** **Institut für Molekularbiologie, Umeå Universität, Schweden**
Untersuchung der Beziehung der Anaplastischen Lymphom Kinase (ALK) und dem MYCN-Promoter in Zusammenhang mit Tumoren
Betreuer: Prof. Dr. Bengt Hallberg
- 07/2011–
10/2011** **II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**
Charakterisierung von Vorläufer-B-Zellen beim Multiplen Myelom
Betreuer: Prof. Dr. Mascha Binder
- 01/2010–
03/2010** **Institut für Biochemie und Signaltransduktion, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**
Untersuchung einer GM-CSF-abhängigen myeloischen Leukämiezelllinie in Zusammenhang mit Cytokine-like 1
Betreuer: Prof. Dr. Manfred Jücker
- 08/2009–
10/2009** **Evotec AG, Hamburg**
Fragment-basiertes GPCR-Screening: Identifizierung von Histamin-Rezeptor-Subtyp-spezifischen Fragmenten
Betreuer: Dr. Andreas Kahrs

Publikationen

- 04/2017** Lilja J, Zacharchenko T, Georgiadou M, Jacquemet G, Franceschi N, Peuhu E, Hamidi H, Pouwels J, **Martens V**, Nia FH, Beifuss M, Boeckers T, Kreienkamp HJ, Barsukov IL, Ivaska J. SHANK proteins limit integrin activation by directly interacting with Rap1 and R-Ras. Nat Cell Biol. 2017 Apr;19(4):292-305.
- 07/2015** I Siekmann, K Dierck, S Prall, M Trochimiuk, **V Martens**, M Khosh, K Abt, F Beck, I Jeremias, A Sickmann, P Nollau, MA Horstmann. PAK2 (p21-activated kinase 2) – A Key Node in FLT3 Dependent Signaling in Acute Lymphoblastic Leukemia. Klin Padiatr 2015; 227 - A31
- 02/2012** Trepel M, **Martens V**, Doll C, Rahlff J, Gösch B, Loges S, Binder M. Phenotypic detection of clonotypic B cells in multiple myeloma by specific immunoglobulin ligands reveals their rarity in multiple myeloma. PLoS One. 2012;7(2):e31998.

Sprachen

Deutsch	Muttersprache
Englisch	Fließend
Französisch	Grundkenntnisse
Schwedisch	Grundkenntnisse
Latein	Latinum

Weitere Qualifikationen

- 12/2016** Mauskurs
- Seit 2013** Unterstützende Tätigkeit als Dozentin bei Seminaren und Praktika für Medizinstudenten

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den

Victoria Martens